

**Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
und der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie**

Direktoren: Prof. Dr. D. B. Jones, PhD M.I. Biol. bzw.
Prof. Dr. med. S. Ruchholtz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Chondrozytärer Kohlenhydratmetabolismus
und Zellvitalität boviner artikulärer
Knorpelimplantate in statischer Kultur zur Analyse
der Bedeutung von FCS und des nutritiven
Potentials von Fructose für Knorpel *in vitro***

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Elisa Teifke aus Berlin

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
23. September 2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. D. B. Jones, PhD M.I. Biol.

1. Korreferent: Prof. Dr. R. Lill

Abstract

Cartilage that is obtained from cultivation *in vitro* does not yield satisfactory results when used in the therapy of articular cartilage lesions due to a deficient collagen synthesis (Breinan *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 1995; Green, 1977; Kim *et al.*, 2003; Kock *et al.*, 2012; Miot *et al.*, 2006; Wakitani *et al.*, 1989). The intent of this work was to further current understandings of how to optimally cultivate cartilage, thus facilitating better results in its tissue engineering.

Usually, cartilage culture medium contains glucose and FCS (Chua *et al.*, 2005; Moo *et al.*, 2011; Ramakrishnan *et al.*, 2011; Sah *et al.*, 1990; Thal *et al.*, 1986; Yang and Barabino, 2011). However FCS can negatively influence tissue homeostasis by its potentially dedifferentiating effect (Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008; Narcisi *et al.*, 2012). Moreover, glucose can be toxic to cells in cases of excess supply (Lorenzi *et al.*, 1985; Russell, 1993). It can also lead to an accumulation of lactate, the main end-product of chondrocyte metabolism (Lee and Urban, 1997), and to a decrease of the pH-value in the medium. The latter can disturb chondrocyte metabolic activity and derange cartilage matrix architecture (Bhosale and Richardson, 2008; Das *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1976; Wu *et al.*, 2007). Concerning non-cartilage cells it is known that a stable pH-value during cultivation can be achieved by substituting glucose with fructose (Barngrover *et al.*, 1985; Imamura *et al.*, 1982). This study evaluated whether the same applies to chondrocytes and whether cartilage cells even have the ability to metabolize fructose as suggested by Ohara *et al.* (2001).

By assessing chondrocyte carbohydrate metabolism and cell viability *in vitro* the following specific questions were supposed to be answered:

1. Is FCS a beneficial nutritive supplement in addition to ITS (Insulin-Transferrin-Selenium)?
2. As an alternate to glucose in the culture medium, can fructose serve as a chondrocyte energy source minimizing lactate production and pH-shift?
3. How much is the energy demand of the cultured cartilage and how does it influence cell metabolism and viability?

96 chips of bovine articular cartilage were obtained from the shoulder joints of an 18 months old animal and assigned to 16 different test groups. Static incubation was carried out in culture multiwell plates at 37° C under atmospheric pressure of O₂ and CO₂. The culture medium (DMEM) was exchanged every 48 hours and used in 4 different variants: M1A - 1 g/L Fructose; M1B - 1 g/L Fruct, 2 % (V/V) FCS; M2A - 1 g/L Glucose; M2B - 1 g/L Gluc, 2 % (V/V) FCS. Each type contained 2 mM glutamine and 1 % (V/V) ITS. For every variant there was one group provided with 2 mL and another one supplied with 5 mL of medium. Each of these conditions was applied both to a group being cultivated 8 days and to another with 16 days of incubation. 10 freshly excised samples were used as controls and formalin-fixed and paraffin-embedded without cultivation. The cultured cartilage was processed in the same manner after 8 or 16 days, respectively. Tissue sections were HE-stained and immunohistochemically treated (TUNEL and M30 CytoDEATH®) for assessing and quantifying chondrocyte viability with a light microscope. Glucose-/fructose-, lactate- and LDH-content was analysed in the

Abstract

medium by photometric methods. The pH-values were measured with a pH meter. The statistical analysis was done by applying the non-parametric Kruskal-Wallis (H) test followed by a Bonferroni corrected Mann-Whitney U post-hoc test which compared groups that differed in one experimental condition.

The portion of histomorphologically viable cells averaged out at $90,8 \pm 5,3$ % for the controls (freshly excised, not cultivated) and overall at $66,4 \pm 18,9$ % for the test groups. While viability of the controls was higher than cell survival in the collective of cultivated cartilage (estimated difference $\sim \Delta$: 20,5 %; p-value < 0,05), the U test indicated no significant differences of viability between the different experimental groups. Evaluating cell survival on the basis of liberated LDH as a marker of cell death also did not show statistical differences between the test groups. Carbohydrate uptake was four or more times lower than the supplied sugar amount. The carbohydrate use in the glucose groups exceeded the consumption in the fructose groups during the first 12 days with no exception (U test: $\sim \Delta$: 0,2-0,98 mg; p-value < α' for each comparison done, $\alpha' = 0,05/12 = 0,0042$ Bonferroni corrected). During the last two intervals of incubation 25 % of the comparisons yielded the same result while the remaining comparisons showed no statistical significance. When comparing the 2-mL- with the 5-mL-supply significant results (p-value < α' , $\alpha' = 0,05/12 = 0,0042$) showed that higher medium supply resulted in higher carbohydrate uptake ($\sim \Delta$: 0,15-0,58 mg). Assessing the effect of FCS there were cases with significant increases of metabolized sugar as well as others in which FCS decreased carbohydrate metabolism. Chondrocyte lactate production was significantly higher in the glucose than in the fructose groups. With one exception ($p > \alpha'$), this difference was found for all of the 4 comparisons done for each incubation interval. It amounts to a range of $\sim \Delta$ between 0,14 mg and 0,64 mg (p-value < α' , $\alpha' = 0,05/4 = 0,0125$). There was a negative correlation between lactate production and pH-value (Pearson correlation coefficient: -0,62; p-value < 0,05). The pH-value was significantly higher, i. e. closer to the physiological value of 7,4 (van den Berg, 2003), in the fructose than in the glucose groups ($\sim \Delta$: 0,11-0,39).

In conclusion, the questions posed at the beginning can be answered as follows:

1. Supplementing culture medium with FCS is not beneficial for chondrocyte viability and does not increase cartilage carbohydrate metabolism. In this regard it cannot be recommended as a medium additive.
2. Fructose can replace glucose in the medium. **To my knowledge, this study is the first to show that chondrocytes can metabolize fructose for energy production.** Without affecting cell viability fructose yields lower carbohydrate consumption with lower lactate production and a more stable pH-value in the culture medium than glucose.
3. Cartilage nutritive demand was far lower than the amount supplied and can be reduced to approximately one third ($\sim 0,33$ mg/L) in the future. A high carbohydrate supply resulted in an increase in carbohydrate metabolism, lactate production and pH-shift while it did not influence cell viability.

Abstract

Future studies are needed to investigate whether the results above for a static cultivation apply to a cartilage culture under mechanical stimulation. I suggest an additional monitoring of glutamine metabolism, matrix synthesis and degradation as well as an increased number of samples ($n \approx 40$ per group, depending on the question).

Zusammenfassung

Die *In-Vitro*-Züchtung von Gelenkknorpel zur therapeutischen Defektdeckung von Knorpelläsionen scheitert an einer korrekten Kollagensynthese (Breinan et al., 2001; Chu et al., 1995; Green, 1977; Kim et al., 2003; Kock et al., 2012; Miot et al., 2006; Wakitani et al., 1989), die für einen Therapieerfolg wichtig wäre (DiMicco and Sah, 2001). Diese Arbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag zur Etablierung zellkultureller Bedingungen zu leisten, die zukünftig bessere Resultate i. R. dieses *Tissue Engineering* erlauben.

Gewöhnlich wird Knorpel *in vitro* mit einem Glucose-haltigen, FCS-supplementierten Nährmedium versorgt (Chua et al., 2005; Moo et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2011; Sah et al., 1990; Thal et al., 1986; Yang and Barabino, 2011). FCS kann durch seine dedifferenzierende Wirkung (Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008; Narcisi et al., 2012) jedoch negativ Einfluss auf die Knorpelhomöostase nehmen. Auch ist unter Kultivierung mit Glucose eine toxische Wirkung für Zellen bei überschüssigem Angebot möglich (Lorenzi et al., 1985; Russell, 1993). Es kann dabei außerdem zu einer Akkumulation von Lactat, des Hauptendmetaboliten der chondrozytären Glykolyse (Lee and Urban, 1997), mit pH-Wert-Erniedrigung sowie dadurch bedingten negativen Auswirkungen auf die metabolische Aktivität von Chondrozyten und die Geometrie der Knorpelmatrix kommen (Bhosale and Richardson, 2008; Das et al., 2010; Gray et al., 1988; Schwartz et al., 1976; Wu et al., 2007). Für die Kultur anderer Zellen ist bekannt, dass sich zwecks stabilen pH-Werts der Einsatz von Fructose anstelle von Glucose eignet (Barngrover et al., 1985; Imamura et al., 1982). In dieser Studie wurde daher u. a. getestet, ob dies auch für die Kultivierung von Knorpelgewebe gilt und Chondrozyten, wie von Ohara et al. (2001) vermutet, Fructose verstoffwechseln können.

Unter Beleuchtung des chondrozytären Kohlenhydratstoffwechsels und Zellüberlebens *in vitro* sollten konkret folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist FCS als Nährmediumsupplement zusätzlich zu ITS vorteilhaft?
2. Kann Fructose Glucose im Medium als chondrozytäres Energiesubstrat mit Minimierung von Lactatproduktion und pH-Wert-Verschiebung ersetzen?
3. Wie hoch ist der Energiebedarf des kultivierten Knorpels und hat die Höhe des nutritiven Angebots Auswirkungen auf Zellmetabolismus bzw. -vitalität?

Dazu wurden 96 Knorpelchips aus den Schultergelenken eines eineinhalb Jahre alten Rindes 16 Versuchsgruppen zugeordnet und bei 37° C sowie atmosphärischem O₂- und CO₂-Gehalt unter statischen Bedingungen in Multiwell-Platten inkubiert. Das Nährmedium (DMEM) wurde alle 48 h gewechselt und in 4 Varianten eingesetzt: M1A - 1 g/L Fructose; M1B - 1 g/L Fruct, 2% (V/V) FCS; M2A - 1 g/L Glucose; M2B - 1 g/L Gluc, 2 % (V/V) FCS. Alle enthielten 2 mM Glutamin und 1 % (V/V) ITS. Für jeden Medientyp gab es eine mit 2 mL versorgte Gruppe und eine weitere mit 5 mL. Jede dieser Bedingungen fand sich in einer 8- und einer 16-tägig geführten Gruppe wieder. Als Kontrollen wurden 10 Chips direkt nach der Biopsie ohne Kultivierung in Formaldehyd-Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Auch die kultivierten Knorpel wurden bei Versuchsende so aufgearbeitet. Anhand der an Gewebeschnitten

Zusammenfassung

durchgeführten HE-Färbung und immunhistochemischen Methoden TUNEL bzw. M30 CytoDEATH® wurde der Vitalitätszustand der Chondrozyten bestimmt und am Lichtmikroskop quantifiziert. In Mediumüberständen wurden Glucose- bzw. Fructose- sowie Lactat- und LDH-Gehalt nach photometrischem Prinzip bestimmt und der pH-Wert gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Kruskal-Wallis-(H-)Test und *post hoc* einem Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test. Dabei wurden i. R. des U-Tests Paare verglichen, die sich in nur einer Versuchsbedingung unterschieden.

Der Anteil histomorphologisch vitaler Zellen der nicht kultivierten Kontrollen lag bei durchschnittlich $90,8 \pm 5,3 \%$, in den Versuchsgruppen global bei $66,4 \pm 18,9 \%$. Während die Vitalität der Kontrollen das Zellüberleben des kultivierten Knorpels gesamt überstieg (geschätzter Lageunterschied $\sim\Delta$: 20,5 %; p-Wert < 0,05), gab es keine signifikanten Vitalitätsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen für die i. R. des U-Tests durchgeführten Paarvergleiche. Letzteres galt auch für die Beurteilung des Zellüberlebens anhand des freigesetzten biochemischen Zelltodmarkers LDH. Der Kohlenhydratverbrauch betrug maximal ca. ein Viertel des Angebots. Er war in den Glucosegruppen während der ersten 12 Versuchstage sämtlich größer als in den entsprechenden Fructosegruppen (U-Test: $\sim\Delta$: 0,2-0,98 mg; p-Wert < α' für alle Paarvergleiche, $\alpha' = 0,05/12 = 0,0042$ nach Bonferroni). In den letzten beiden Inkubationsintervallen gab es diesen Unterschied in 25 % der Vergleiche bei ansonsten nicht signifikanten Differenzen. Ein Mehrangebot an Nährmedium förderte in den Paarvergleichen „2 mL vs. 5 mL“ mit signifikantem Unterschied (p-Wert < α' , $\alpha' = 0,05/12 = 0,0042$) den Zuckerverbrauch ($\sim\Delta$: 0,15-0,58 mg). Die Vergleiche für FCS ergaben, dass FCS in einigen Fällen zu einer signifikanten Erhöhung, in anderen zu einer Erniedrigung des Kohlenhydratstoffwechsels geführt hatte. Die chondrozytäre Lactatproduktion war mit einem $\sim\Delta$ von 0,14 mg bis 0,64 mg (p-Wert < α' , $\alpha' = 0,05/4 = 0,0125$) für alle 4 Paarvergleiche „Fructose vs. Glucose“ zu jedem Versuchszeitpunkt bis auf eine Ausnahme (p > α') in den Glucosegruppen höher. Sie korrelierte negativ mit dem pH-Wert (Pearson-Koeffizient: -0,62; p-Wert < 0,05), der in den Fructosemedien im Versuchsverlauf ausnahmslos signifikant größer - i. e. näher an den physiologischen 7,4 (van den Berg, 2003) - als in den Glucosemedien war ($\sim\Delta$: 0,11-0,39).

Als Fazit bleibt unter Berücksichtigung der eingangs gestellten Fragen dies festzuhalten:

1. FCS im Nährmedium bringt Chondrozyten keinen Überlebensvorteil und erhöht ihren Kohlenhydratstoffwechsel nicht. Somit kann es in dieser Hinsicht als Supplement nicht empfohlen werden.
2. Fructose kann Glucose im Medium ersetzen. **Im Rahmen dieser Studie wurde meines Wissens erstmalig gezeigt, dass Knorpelzellen Fructose zur Energiegewinnung verstoffwechseln können.** Ohne Auswirkung auf die Zellvitalität bewirkt Fructose im Vergleich zu Glucose eine niedrigere Kohlenhydratausschöpfung, Lactatproduktion und pH-Wert-Verschiebung in den Kulturmedien.

Zusammenfassung

3. Der Nährstoffbedarf von Knorpel lag weit unter der angebotenen Menge und könnte in Zukunft auf ca. ein Drittel ($\sim 0,33$ mg/L) reduziert werden. Bei höherem Zuckerangebot waren Kohlenhydratstoffwechsel, Lactatanfall und pH-Wert-Verschiebung ebenfalls größer, die Zellvitalität blieb unbeeinflusst.

Zukünftige Arbeiten sollten untersuchen, ob die o. g. Ergebnisse für eine statische Kultur ebenfalls für eine Kultivierung von Knorpel unter mechanischer Belastung gelten. Dafür schlage ich ein zusätzliches Monitoring von Glutaminstoffwechsel, Matrixsynthese und -abbau sowie eine Erhöhung der Stichprobengröße ($n \approx 40$ pro Gruppe, je nach Fragestellung) vor.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	1
II	Verzeichnis der Abkürzungen, Zeichen und Symbole	4
III	Einleitung	8
<u>III.1</u>	<u>Einführung</u>	<u>8</u>
<u>III.2</u>	<u>Aufbau und Funktion von Gelenkknorpel</u>	<u>8</u>
III.2.1	Anatomische Grundlagen des diarthrotischen Gelenks	8
III.2.2	Gelenkknorpelstruktur	9
III.2.3	Funktionale Eigenschaften	10
<u>III.3</u>	<u>Ernährung und Stoffwechsel von Chondrozyten</u>	<u>11</u>
III.3.1	Synovialflüssigkeit	11
III.3.2	Metabolismus von Knorpelzellen	12
III.3.2.1	Energiestoffwechsel	12
III.3.2.2	Matrixsynthese	13
III.3.2.3	Zellumsatz	14
III.3.3	Bedeutung von Zytokinen, Serum- und Zellfaktoren	15
IV	Fragestellungen und Ziele	17
V	Material und Methoden	18
<u>V.1</u>	<u>Material</u>	<u>18</u>
V.1.1	Laborgeräte und -instrumente	18
V.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
V.1.3	Chemikalien	21
V.1.4	Kits	23
V.1.5	Lösungen, Puffer und Nährmedien	23
V.1.6	Biomaterial	29
<u>V.2</u>	<u>Methoden</u>	<u>29</u>
V.2.1	Versuchsaufbau	30
V.2.1.1	Präparation der Knorpelchips	30
V.2.1.1.1	Freilegen und Biopsie des Gelenkknorpels	30
V.2.1.1.2	Vorbehandlung der Explantate	31
V.2.1.1.3	Bestimmung des Nassgewichts	32
V.2.1.1.4	Gewebefixierung der Nullkontrollen	32

Inhaltsverzeichnis

V.2.1.2	Kultivierung	32
V.2.1.2.1	Allgemeine Bedingungen	33
V.2.1.2.2	Versuchsgruppen	33
V.2.1.2.3	Mediumwechsel	35
V.2.1.2.4	Mikroskopische Kontrollen	37
V.2.1.3	Versuchsende	37
V.2.1.3.1	Bestimmung des Nassgewichts	38
V.2.1.3.2	Gewebefixierung	38
V.2.1.3.3	Mikroskopische Kontrolle der bioplatfreien Platten	38
V.2.2	Aufbereitung der fixierten Explantate	38
V.2.3	Histologische und immunhistochemische Verfahren	40
V.2.3.1	HE-Färbung und histomorphologischer Score	40
V.2.3.2	TUNEL	42
V.2.3.3	M30 CytoDEATH®	43
V.2.4	Biochemische Analysen der Medienüberstände	46
V.2.4.1	pH-Wert-Bestimmung	46
V.2.4.2	Kohlenhydratstoffwechsel	47
V.2.4.2.1	Glucose-/Fructose-Assay	47
V.2.4.2.2	Lactat-Bestimmung	50
V.2.4.3	LDH-Bestimmung	51
V.2.5	Statistische Methoden	52
VI	Ergebnisse	54
<u>VI.1</u>	<u>Knorpelvitalität - die Experimentalgruppen im Vergleich</u>	<u>54</u>
VI.1.1	Histologische und immunhistochemische Beurteilung	54
VI.1.1.1	Histomorphologischer Score	54
VI.1.1.2	M30 CytoDEATH®	60
VI.1.1.3	TUNEL-Methode	61
VI.1.2	LDH-Release als Surrogatparameter im Verlauf	62
<u>VI.2</u>	<u>Knorpelmetabolismus - die Experimentalgruppen im Vergleich</u>	<u>64</u>
VI.2.1	Aktivität des Kohlenhydratstoffwechsels im Verlauf	64
VI.2.1.1	Fructose- bzw. Glucoseverbrauch	64
VI.2.1.2	Lactatproduktion	66
VI.2.1.3	pH-Wert-Verhalten	70
VI.2.2	Nassgewicht zu Versuchsbeginn und -ende	71
<u>VI.3</u>	<u>Kontaminationen</u>	<u>72</u>

Inhaltsverzeichnis

VII	Diskussion	73
<u>VII.1</u>	<u>Knorpelvitalität</u>	<u>73</u>
VII.1.1	Histologie und Immunhistochemie	73
VII.1.2	LDH-Release	75
<u>VII.2</u>	<u>Chondrozytärer Metabolismus</u>	<u>76</u>
VII.2.1	Kohlenhydratverbrauch	76
VII.2.2	Lactatproduktion	77
VII.2.3	pH-Wert-Verhalten	77
VII.2.4	Entwicklung des Nassgewichts	78
<u>VII.3</u>	<u>Limitationen</u>	<u>78</u>
<u>VII.4</u>	<u>Fazit</u>	<u>79</u>
<u>VII.5</u>	<u>Ausblick</u>	<u>81</u>
VIII	Literatur	83
IX	Anhang	90
<u>IX.1</u>	<u>Tabellen</u>	<u>90</u>
<u>IX.2</u>	<u>Verzeichnis der akademischen LehrerInnen</u>	<u>104</u>
<u>IX.3</u>	<u>Dank</u>	<u>104</u>

I **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildungen

<u>Abb. 1:</u> Die Knorpelschichten	10
<u>Abb. 2:</u> Ein Chondron mit Matrixzonen	10
<u>Abb. 3:</u> Gelenkkopf nach erfolgter Probengewinnung	31
<u>Abb. 4:</u> Graphische Darstellung eines biopierten Knorpelchips	31
<u>Abb. 5:</u> Kulturplattenbelegung mit den Knorpelchips bei den 6-Well-Platten	34
<u>Abb. 6:</u> Kulturplattenbelegung mit den Knorpelchips bei den 12-Well-Platten	34
<u>Abb. 7:</u> Die belegte 12-Well-Kulturplatte von Gruppe 7	35
<u>Abb. 8:</u> Die 6-Well-Kulturplatte von Gruppe 6 während eines Mediumwechsels	37
<u>Abb. 9:</u> Schnittpräparation von Paraffinschnitten und deren Platzierung auf Objektträgern	39
<u>Abb. 10 - 15:</u> Mikroskopische Bildausschnitte HE-gefärbter Gewebeschnitte zur Veranschaulichung der Kategorien des histomorphologischen Scores	41
<u>Abb. 10:</u> Vitale neben apoptotischen Zellen; Chip 15.1	41
<u>Abb. 11:</u> Vitales Chondron; Kontrolle	41
<u>Abb. 12:</u> Apoptotisches Chondron; Chip 13.3	41
<u>Abb. 13:</u> Apoptotische Zellen mit <i>apoptotic bodies</i> ; Chip 2.1	41
<u>Abb. 14:</u> Nekrotische Zelle; Chip 2.1	41
<u>Abb. 15:</u> Nekrotische Zelle; Chip 10.6	41
<u>Abb. 16:</u> Das immunhistochemische Prinzip der TUNEL-Methode	43
<u>Abb. 17:</u> Das immunhistochemische Prinzip der M30-CytoDEATH®-Methode	44
<u>Abb. 18 / 19:</u> Mikroskopische Bildausschnitte M30-CytoDEATH®-behandelter Gewebeschnitte zur Veranschaulichung der Kategorien „M30-negativ“ und „-positiv“	46
<u>Abb. 18:</u> Zwei M30-negative Chondrone; Kontrolle 5	46
<u>Abb. 19:</u> M30-positive und M30-negative Zelle; Chip 4.4	46
<u>Abb. 20:</u> Chemische Reaktionsgleichungen des Assays zur quantitativen Bestimmung von Glucose und Fructose	47
<u>Abb. 21:</u> Streudiagramm der ΔOD_{340} -Werte der Fructose-Standards	49
<u>Abb. 22:</u> Chemische Reaktionsgleichungen des Assays zur quantitativen Bestimmung von Lactat	51
<u>Abb. 23:</u> Die Warburg-Reaktion	51

<u>Abb. 24:</u> Histogramm und Boxplot zur Häufigkeitsverteilung der histomorphologischen Knorpelvitalität	56
<u>Abb. 25:</u> Multi-Boxplot-Grafik zur histomorphologischen Knorpelvitalität in Versuchsgruppen und Kontrollen	57
<u>Abb. 26:</u> Gruppiertes Säulendiagramm zur Gegenüberstellung der histomorphologischen vs. immunhistochemischen Knorpelvitalität	61
<u>Abb. 27:</u> Multi-Boxplot-Grafik zur kumulativen LDH-Freisetzung in den Versuchsgruppen	63
<u>Abb. 28:</u> Verlaufskurven der LDH-Freisetzung	64
<u>Abb. 29:</u> Verlaufskurven des Kohlenhydratverbrauchs	65
<u>Abb. 30:</u> Verlaufskurven der Lactatproduktion	67
<u>Abb. 31:</u> Verlaufskurven der Differenz zwischen Kohlenhydratverbrauch und Lactatproduktion	70
<u>Abb. 32:</u> Verlaufskurven des pH-Wertes in den Medienüberständen	71

Tabellen

<u>Tab. 1:</u> Abkürzungen, Zeichen und Symbole	4
<u>Tab. 2:</u> Laborgeräte und -instrumente	18
<u>Tab. 3:</u> Verbrauchsmaterialien	20
<u>Tab. 4:</u> Chemikalien	21
<u>Tab. 5:</u> Kits	23
<u>Tab. 6:</u> Zusammensetzungen der Nährmedien	24
<u>Tab. 7:</u> Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer	27
<u>Tab. 8:</u> Versuchsgruppen und ihre Experimentalbedingungen	33
	54
<u>Tab. 9:</u> Protokoll der M30-CytoDEATH®-Methode	45
<u>Tab. 10:</u> Protokoll des Glucose-/Fructose-Assays	48
<u>Tab. 11:</u> Statistische Kennwerte der histomorphologischen Knorpelvitalität	55
<u>Tab. 12:</u> Klassifizierte Häufigkeiten des prozentualen Anteils histomorphologisch vitaler Zellen	90
<u>Tab. 13:</u> Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiede in der histomorphologischen Knorpelvitalität mit <i>Post-hoc</i> -Analyse	58
<u>Tab. 14:</u> Mittelwert und Median des prozentualen Anteils M30-CytoDEATH®-negativer Zellen	90
<u>Tab. 15:</u> Klassifizierte Häufigkeiten des kumulativ freigesetzten LDH	62
<u>Tab. 16:</u> Statistische Kennwerte des kumulativ freigesetzten LDH	90
<u>Tab. 17:</u> Statistische Kennwerte der LDH-Freisetzung im Verlauf	91
<u>Tab. 18:</u> Statistische Kennwerte des Kohlenhydratverbrauchs im Verlauf	92
<u>Tab. 19:</u> Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiede im Kohlenhydratverbrauch mit <i>Post-hoc</i> -Analyse	94
<u>Tab. 20:</u> Statistische Kennwerte der Lactatproduktion im Verlauf	98
<u>Tab. 21:</u> Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiede in der Lactatproduktion mit <i>Post-hoc</i> -Analyse	68
<u>Tab. 22:</u> Statistische Kennwerte der Differenz zwischen Kohlenhydratverbrauch und Lactatproduktion im Verlauf	99
<u>Tab. 23:</u> Mittelwert des pH-Werts in den Mediumüberständen im Verlauf	100
<u>Tab. 24:</u> Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests auf Unterschiede im pH-Wert mit <i>Post-hoc</i> -Analyse	101
<u>Tab. 25:</u> Klassifizierte Häufigkeiten der prozentualen Zunahme des Nassgewichts der Knorpelproben	103
<u>Tab. 26:</u> Statistische Kennwerte der prozentualen Nassgewichtszunahme der Knorpelchips	103

II Verzeichnis der Abkürzungen, Zeichen und Symbole

Das Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, (Formel-)Zeichen und Symbole ist soweit möglich alphabetisch sortiert und beinhaltet sehr gebräuchliche, universell verwendete nicht.

Tab. 1: Abkürzungen, Zeichen und Symbole

Abkürzung / Zeichen / Symbol	Bedeutung
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
α	Signifikanzniveau
α'	multiple Signifikanzniveau
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calciumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CK	Zytokeratin
d	Tag
DAB	(3,3')-Diaminobenzidin
dest.	<i>destillata</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E	$\times 10^{\wedge}$
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
exkl.	exklusive
f	Freiheitsgrad
Fruct / F	Fructose (F auch: Inkubationsphase F)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
F-6-P	D-Fructose-6-phosphat
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Gluc / G	Glucose (G auch: Inkubationsphase G)
H_0	Nullhypothese

Tab. 1 - Fortsetzung: Abkürzungen, Zeichen und Symbole

Abkürzung / Zeichen / Symbol	Bedeutung
$H_{A/II/III}$	Alternativhypothesen
HCO_3^-	Hydrogencarbonat-Ion
HE	Hämatoxylin-Eosin
HeLa-Zellen	menschliche Epithelzellen (HeLa-Stamm eines Zervixkarzinoms)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i> (Hypoxie-induzierter Faktor)
HK	Hexokinase
H-Test	Kruskal-Wallis-Test
HWZ	Halbwertszeit
i. A.	im Allgemeinen
i. e.	<i>id est</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
Inf	Unendlich
inkl.	inklusive
i. R.	im Rahmen
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
K	Kontrolle
kat	Katal
kBar	Kilobar
KH	Kohlenhydrat
KI	Konfidenzintervall
LDH	Lactatdehydrogenase
lfd.	laufende
LOD	Lactat-Oxidase
-lsg	-lösung
M	Mol
Max	Maximum
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesiumion
m. H.	mit Hilfe
min	Minute
Min	Minimum
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

Tab. 1 - Fortsetzung: Abkürzungen, Zeichen und Symbole

Abkürzung / Zeichen / Symbol	Bedeutung
MS	Microsoft
MT	Mediumtyp
MW	Mittelwert
μ-	Mikro-
n	Anzahl
N	Formelzeichen der Dimension einer Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	(reduziertes) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NK	Nullkontrolle
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
OT	Objektträger
p	p-Wert; Partialdruck
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGI	Phosphoglucose-Isomerase
POD	Peroxidase
®	registrierte Warenmarke
R ²	Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsanalyse
RT	Raumtemperatur
s. (o. / u.)	siehe (oben / unten)
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Stmlsg	Stammlösung
Tab.	Tabelle
TC	<i>Tissue Culture</i>
TDB	<i>TUNEL Dilution Buffer</i>
TdT	Terminale Deoxynukleotidyltransferase

Tab. 1 - Fortsetzung: Abkürzungen, Zeichen und Symbole

Abkürzung / Zeichen / Symbol	Bedeutung
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TM	unregistrierte Warenmarke
TNF	Tumornekrosefaktor
TRA	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling</i>
U	<i>Unit</i>
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
U-Test	Mann-Whitney-U-Test
Var.-breite	Variationsbreite (Max - Min)
Var.-koeff.	Variationskoeffizient (SD/MW)
versch.	verschiedene
vs.	<i>versus</i>
V/V	<i>Volume to Volume</i>
W	Watt
w/	<i>with</i>
w/o	<i>without</i>
a; y; z	Variablen
x	Variable; ,multipliziert mit'
\geq / \leq	größer / kleiner gleich
\sim	ca.; ,korreliert mit'
Δ	delta, (Ver-)Änderung (Zu- bzw. Abnahme), Differenz
\wedge	,hoch' (einem Exponenten vorangestellt)
[]	Einheitenklammer
\emptyset	Durchmesser; ,kein'
\rightarrow	Testentscheidung (i. R. statistischer Tests)
*	Signifikanzsternchen (p-Wert < α bzw. α'); ,Erläuterung / Anmerkung an anderer Stelle im Text'
°	Grad; ,Erläuterung / Anmerkung an anderer Stelle im Text'
#	,Erläuterung / Anmerkung an anderer Stelle im Text'

III Einleitung

III.1 Einführung

Das übergreifende Motiv zur Durchführung dieser Studie war die hohe Prävalenz symptomatischer Knorpelläsionen begleitet von erheblicher Reduktion der Lebensqualität bei gleichzeitigem Fehlen langfristig zufriedenstellender Therapieoptionen (Arøen et al., 2004; Bhosale and Richardson, 2008; Heir et al., 2009; Kock et al., 2012).

Gelenkknorpel ist aufgrund seiner avaskulären Natur ein Gewebe mit geringer Selbstheilungstendenz (Khan et al., 2008; Stockwell, 1979; Stockwell, 1991). Doch auch sämtliche therapeutischen Interventionen scheitern an der Generierung normalen hyalinen Knorpels, sodass Defekte selbst bei optimalem Verlauf mit einem Faserknorpel-artigen, wenig widerstandsfähigen Gewebe gedeckt werden (Bhosale and Richardson, 2008; Kock et al., 2012). Das derzeit vielversprechendste Therapieverfahren, die Implantation von *in vitro* gezüchtetem Knorpelgewebe, macht da keine Ausnahme, weil die hierbei synthetisierte Knorpelmatrix strukturell von der geometrischen Organisation nativen Gewebes abweicht und einen unphysiologisch geringen Kollagenanteil aufweist (Breinan et al., 2001; Chu et al., 1995; Green, 1977; Kim et al., 2003; Kock et al., 2012; Miot et al., 2006; Wakitani et al., 1989). Eine korrekte Kollagensynthese ist jedoch essentiell für Einwachsen und mechanische Integration transplantierten Knorpels (DiMicco and Sah, 2001).

Die im Folgenden beschriebene 16-tägige statische Kultur boviner Knorpel explantate unter verschiedenen Nährstoffangeboten sollte dazu beitragen, in Zukunft die nötigen Bedingungen für ein *Tissue Engineering* von Knorpel physiologischer Qualität schaffen zu können. Dabei stand einerseits die Lösung zellkultureller, im Rahmen dieser *In-Vitro*-Züchtung auftretender Probleme, wie z. B. Lactatakkumulation mit pH-Wert-Verschiebung, im Blickpunkt und andererseits ein bei wissenschaftlicher Unklarheit und defizitärem Wissen gewünschter Erkenntnisgewinn hinsichtlich chondrozytären nutritiven Bedarfs, Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsels sowie Überlebens *in vitro*.

III.2 Aufbau und Funktion von Gelenkknorpel

III.2.1 Anatomische Grundlagen des diarthrotischen Gelenks

Diarthrosen, sog. echte Gelenke, bestehen aus Gelenkknorpel, -höhle, -kapsel sowie -bändern (Schiebler et al., 2003). Bei embryonal knorpelig präformierten Knochen besteht ihr Gelenkknorpel aus hyalinem Knorpel, dessen spiegelnd glatter Oberfläche ein faseriges Perichondrium fehlt (*ibid.*). Die gut innervierte und damit äußerst schmerzempfindliche Gelenkkapsel umschließt das Gelenk allseitig und besteht als Fortsetzung des Periostschlauchs der in Verbindung stehenden Knochen aus einer äußeren Faserschicht (*Membrana fibrosa*) sowie einer spezifischen Innenschicht, der sehr gut kapillarisierten *Membrana synovialis*, welche an der Bildung der Synovialflüssigkeit beteiligt ist (*ibid.*). Letztere befindet sich in geringer Menge in der Gelenkhöhle und stellt im Spalt zwischen den

kommunizierenden Knorpeloberflächen das Gleitmittel (*ibid.*). Gelenkbänder sind meist in die *Membrana fibrosa* eingearbeitet und führen die Gelenkbewegungen (*ibid.*).

III.2.2 Gelenkknorpelstruktur

Die spezialisierte Form hyalinen Knorpels wie er sich in Synovialgelenken findet, ist ein nicht innerviertes, avaskuläres, alymphatisches und dabei dennoch normalerweise sehr langlebiges Gewebe, das nur zu 1-5 Volumenprozent aus Chondrozyten besteht, welche einzeln oder in isogenen Gruppen, den Chondronen, zu finden sind (*Bhosale and Richardson, 2008; Buckwalter and Mankin, 1997; Stockwell, 1991; Walsh et. al, 2003*). Diese hochspezialisierten Zellen sind für die Synthese und strukturelle Aufrechterhaltung der sie umgebenden Matrix zuständig (*Buckwalter and Mankin, 1997; Stockwell, 1978*), welche je nach Knorpelzone zu 65-80 % aus Wasser besteht (*Bhosale and Richardson, 2008*). Der Rest des Knorpelnassgewichts wird jeweils 10- bis 20-prozentig von Kollagenen bzw. Proteoglykanen gestellt (*Bhosale and Richardson, 2008; Walsh et al., 2003*). Unter den Kollagenen macht Typ II mit 90-95 % den größten Anteil aus (*Buckwalter and Mankin, 1997*). Daneben finden sich u. a. die Typen III, VI, IX, X, XI, XII, und XIV (*Eyre, 2002*). Proteoglykane unterteilen sich einerseits in die Gruppe der großen aggregierenden Proteoglykanmonomere (Aggregane) und andererseits in die kleineren Ausführungen (z. B. Decorin) (*Walsh et al., 2003*). Alle bestehen aus einem Proteinkern mit zahlreichen Glykosaminoglykanketten, zu denen u. a. Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat gehören (*ibid.*). Der physiologische pH-Wert der Interzellulärsubstanz liegt bei 7,4, wobei sich schon leichte Abweichungen auf die Infrastruktur der Knorpelmatrix auswirken können (*Buckwalter and Mankin, 1997; Wu et al., 2007*).

Ultra-strukturell lassen sich in Gelenkknorpel vier fließend ineinander übergehende Schichten unterscheiden, welche sich in Struktur und Zusammensetzung deutlich unterscheiden: In der superfiziellen und dünnsten Schicht (in **Abb. 1** Zone 1) mit einem hohen Kollagenanteil und geringer Proteoglykankonzentration ist der Wassergehalt am größten, die Anordnung feiner Fibrillen parallel zur Gelenkoberfläche und die Form der Chondrozyten ellipsoid (*Bhosale and Richardson, 2008; Buckwalter and Mankin, 1997; Walsh et. al, 2003*). Direkt an der Gelenkoberfläche, welche von einer dünnen Schicht Synovialflüssigkeit überzogen ist, sind keine Zellen zu finden (*Buckwalter and Mankin, 1997*). Zone 2 bildet den Übergang zur mittleren Zone (Zone 3) und weist eine geringere Zelldichte auf mit meist kugeligen Chondrozyten sowie Kollagenfasern größeren Durchmessers, die in schrägen Winkeln zur Gelenkoberfläche und ohne erkennbares System angeordnet sind (*Bhosale and Richardson, 2008*). Die mittlere Zone (Zone 3) hat den höchsten Proteoglykan- und niedrigsten Wassergehalt, Kollagenfasern mit dem größten Durchmesser und die geringste Zelldichte, wobei Zellen und Fasern senkrecht zur Gelenkoberfläche ausgerichtet sind (*Bhosale and Richardson, 2008; Buckwalter and Mankin, 1997*). In der mineralisierten vierten Knorpelzone (Zone 4) finden sich in kalzifizierter Matrix eingebettete, phänotypisch hypertrophe Zellen

mit geringer metabolischer Aktivität, die jedoch als einzige Chondrozyten in der Lage sind, Kollagen Typ X zu synthetisieren (Bhosale and Richardson, 2008).

Des Weiteren kann man in Bezug auf die Knorpelzellen in allen o. g. Schichten zwischen drei Matrixzonen unterscheiden: der perizellulären, territorialen und interterritorialen (s. **Abb. 2**). Die beiden Erstgenannten dienen dem Schutz und der Funktionserhaltung der Chondrozyten, letztere übernimmt das Gros der mechanischen Knorpel Eigenschaften (Buckwalter and Mankin, 1997). Die 2 µm breite perizelluläre Zone zwischen Zelle und Knorpelkapsel ist reich an Proteoglykanen und zellmembranassoziierten Proteinen während die territoriale Matrix, der Knorpelhof, ein kollagenes Netzwerk aus feinen Fibrillen stellt, welches die Chondrozyten einzeln bzw. Chondrozytencluster als Ganzes vor mechanischen Stressoren schützend umgibt (*ibid.*). Der Durchmesser der Kollagenfasern in der voluminösesten, interterritoriellen Zone ist wesentlich größer (*ibid.*). Ihre Anordnung richtet sich in diesem Bereich nicht mehr nach den Knorpelzellen, sondern nach der Gelenkoberfläche aus und unterscheidet sich je nach Knorpelschicht und mechanischer Belastung des Gelenks (*ibid.*).

Abb. 1: Die Knorpelschichten;
(Bhosale and Richardson, 2008)

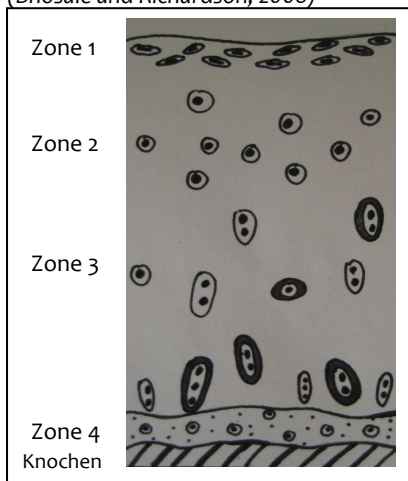
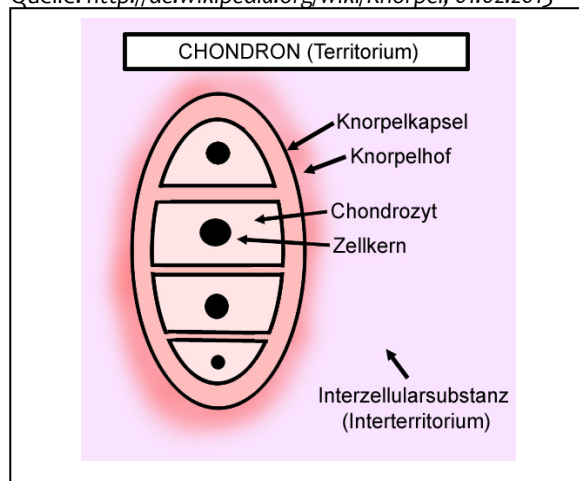


Abb. 2: Ein Chondron mit Matrixzonen,
Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Knorpel>, 01.02.2013



Im Vergleich zu bovinem Knorpel ist menschlicher generell dicker (Rieppo et al., 2003). Allerdings ist sich die histologische Geometrie der einzelnen Schichten zwischen den beiden Spezies sehr ähnlich (*ibid.*). Der Proteoglykangehalt in der Knorpelmatrix nimmt sowohl beim Menschen als auch beim Rind von superfiziell nach knochenah zu (*ibid.*). Auch hinsichtlich kartilaginärer Gewebezellichte sind beide Arten vergleichbar (Stockwell, 1978).

III.2.3 Funktionale Eigenschaften

Hyaliner Knorpel als glatter Überzug kommunizierender knöcherner Gelenkflächen ist essentiell für die Lokomotorik. Gesund sorgt er für minimale Reibung zwischen Gelenkflächen und verteilt mechanische Kräfte so, dass Spitzenbelastungen auf den weniger widerstandsfähigen subchondralen Knochen vermieden werden (Buckwalter and Mankin, 1997). Diese Funktionen werden durch die Matrixinfrastruktur ermöglicht, welche ihrerseits von den Synthese- und Instandhaltungsleistungen der Chondrozyten abhängt (Stockwell,

1978). Die oberflächlichste Zone mit ihrer spiegelnd glatten Oberfläche z. B. minimiert Friktion auf Werte des Reibungskoeffizienten von 0,005-0,02 im menschlichen Sprunggelenk bzw. 0,002-0,03 im bovinen Schultergelenk (Abbot et al., 2003). Dicht gepackte, parallel angeordnete Kollagenfibrillen verleihen dieser Gleitoberfläche besonders große Festigkeit gegen Zug- und Scherkräfte und schützen den Knorpel sowohl vor dem Eindringen immunsystemischer Botenstoffe als auch vor dem Verlust von z. B. Wachstumsfaktoren (Buckwalter and Mankin, 1997). In den übrigen Zonen sind Kollagenetzwerk und Matrixzusammensetzung für die optimale Weiterübertragung mechanischen Stresses auf die gelenkig kommunizierenden Knochen ausgerichtet. Die im Gewebe enthaltenen Proteoglykane interagieren untereinander ebenso wie mit den kartilaginären Kollagenfibrillen und bestimmen u. a. so entscheidend die mechanischen Eigenschaften von Knorpel mit (Walsh et al., 2003). Sie durchsetzen das kollagene Netzwerk, sorgen aufgrund ihrer elektrischen Ladungen für die Elektrolyt- und Flüssigkeitsbalance des Gewebes und tragen v. a. in Form von Aggrekan entscheidend zu seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Abnutzung und mechanischer Belastung bei (Ysart and Mason, 1994).

III.3 Ernährung und Stoffwechsel von Chondrozyten

III.3.1 Synovialflüssigkeit

Die Synovialmembran mit ihren gefäßreichen Falten und gut kapillarisierten Zotten lässt sich unterteilen in das *Synovium*, welches aus flächenhaft ausgebreiteten, nicht interkonnektierten Synoviozyten besteht und das *Subsynovium* mit Fettzellen, Arteriolen, Venolen und kleinen Lymphgefäßen (Davies and Edwards, 1948; Hunter, 1742; Levick, 1995). Das *Synovium* stellt via Filtration und Sekretion die Synovialflüssigkeit und versorgt sie dank stark ausgeprägter Mikrozirkulation und hohem Blutfluss mit Nährstoffen und Sauerstoff für den Knorpel (Hunter, 1742; Levick, 1995). Chondrozyten der superfiziellen Knorpelschicht beteiligen sich ebenfalls an der Synthese der Gelenkschmiere (Blewis et al., 2007; Schumacher et al., 1994). Subsynoviale Lymphwege transportieren Flüssigkeit und Makromoleküle ab, welche aus der Gelenkhöhle über das *Synovium* resorbiert worden sind (Jensen et al., 1993; Levick, 1995).

Die visköse und neben nutritiver und schmierender Eigenschaften auch stoßdämpfend wirkende Synovialflüssigkeit ist quasi ein Ultrafiltrat des Plasmas (Blewis et al., 2007). Verantwortlich für die exzellenten Schmierfähigkeiten sollen vor allem das enthaltene Proteoglykan 4, auch bekannt als Lubricin (Schumacher et al., 2005), die relativ hoch konzentrierte Hyaluronsäure sowie oberflächenaktive Phospholipide zeichnen, welche sämtlich vornehmlich von Synoviozyten sezerniert werden und dem Gelenkknorpel eine verschleiß- und friktionsarme Funktion ermöglichen (Blewis et al., 2007). Darüber hinaus findet sich ein komplexes Milieu an regulatorisch in die Synthese der Synovialflüssigkeit eingreifenden Zytokinen, darunter TNF- α und - β , IL-1 und -6 sowie IGF-1 (*ibid.*). Es finden sich auch Zellen des Immunsystems in der Flüssigkeit, ihr pH-Wert beträgt beim Menschen

zwischen 7,4 und 7,7 (van den Berg, 2003). Der Glucosegehalt liegt wie im Blutplasma bei 4-6 mM (Heywood et al., 2010). Typisch für Synovialflüssigkeit ist des Weiteren ein Sauerstoffanteil von 6-10 % am Gesamtgasdruck, i. e. ca. 45-76 mmHg (Lee and Urban, 1997; Lund-Olesen, 1970).

Traumatisch oder entzündlich bedingte Veränderungen in der Knorpelmatrix alterieren auch die Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit, was sich wiederum auf den kartilaginären und synoviozytären Metabolismus auswirken kann (Blewis et al., 2007; Strangeways, 1920). So kann es bei Chondrozytensterben z. B. zu einem messbaren Anstieg des Zelltodmarkers LDH oder bei arthritischen Prozessen zu einer Konzentrationsverschiebung von Zytokinen kommen (Blewis et al., 2007; Strangeways, 1920).

III.3.2 Metabolismus von Knorpelzellen

III.3.2.1 Energiestoffwechsel

Trotz der hohen individuellen metabolischen Aktivität des einzelnen Chondrozyten, gilt Gelenkknorpel als bradytrophes Gewebe, da aufgrund der niedrigen Zelldichte seine Gesamtaktivität gering ist (Buckwalter and Mankin, 1997). Sauerstoff und andere metabolische Substrate liefert die Synovialflüssigkeit, welche aus dem Kapillarsystem der Synovialmembran gespeist wird (Fisher, 1939). Diese Nährstoffe gelangen - angetrieben von Gelenkbewegungen und abhängig von der Matrixpermeabilität - via Diffusion zu den einzelnen Zellen, wobei ihre Konzentration mit zunehmender Knorpelschichttiefe abnimmt (Maroudas et al., 1968). 95 % des kartilaginären Energiebedarfs werden über die Glykolyse via den klassischen Embden-Meyerhof-Parnas-Weg gedeckt mit Lactat als Hauptendprodukt (Hills, 1940; Lee and Urban, 1997; Lutwak-Mann, 1940; Otte, 1991). Chondrozyten können hypoxische Bedingungen tolerieren und verbrauchen auch unter hohem O₂-Angebot wesentlich weniger Sauerstoff als beispielsweise renale oder hepatische Zellen bei gleicher glykolytischer Aktivität (Stockwell, 1978). In sehr sauerstoffarmer Umgebung erfolgt die Glykolyse ausschließlich anaerob, unter für Knorpel physiologischen O₂-Konzentrationen (≤ 10 % des Gesamtgasdrucks, vgl. III.3.1) ist eine Kombination aus aerober und anaerober glykolytischer Aktivität zu beobachten (Lane et al., 1977). Neben Zucker kann auch die Aminosäure Glutamin von Knorpelzellen als Energiesubstrat genutzt werden, wobei Ammoniak entsteht (Moreira Teixeira et al., 2012). Ein niedriger pH-Wert hemmt den chondrozytären Energiestoffwechsel (Wu et al., 2007).

Knorpelzellen unterliegen dem sog. Crabtree-Effekt, bei dem der Sauerstoffverbrauch zunimmt, wenn das Glucoseangebot sinkt und umgekehrt (Otte, 1991; Rajpurohit et al., 1996). Dies gilt sowohl für Chondrozyten der oberflächlichen als auch für die Zellen der tiefen Knorpelschichten, sodass unter glukopenischen Bedingungen eine ausreichende ATP-Produktion wahrscheinlich mittels oxidativer Phosphorylierung gesichert wird (Heywood et al., 2010; Otte, 1991). Gestützt wird diese Vermutung von der Tatsache, dass die Subpopulation der knochennäheren Knorpelregionen einen höheren O₂-Basalverbrauch hat und damit konform auch ein größeres Mitochondrialvolumen als die oberflächlichen Chondrozyten,

vermutlich um die weiter oben erwähnte, in der tiefen Knorpelschicht vorherrschende geringere Glucosekonzentration aufgrund größerer Entfernung zur nährenden Synovialflüssigkeit zu kompensieren (Heywood *et al.*, 2010).

Mögliche Kohlenhydratquellen für glykolytische Aktivitäten umfassen sowohl knorpelinterne, z. B. in Form von Glykogen, als auch -externe, also Synovialflüssigkeit bzw. *in vitro* Kulturmedium, wobei ein größeres Angebot auch mit einer höheren Aktivität des Energiemetabolismus einhergeht (Lee and Urban, 1997). Für die Zuckeraufnahme steht Chondrozyten eine Diversität an transmembranären Glucosetransportern (GLUT) zur Verfügung, zu denen auch der u. a. für Fructosetransport zuständige GLUT5 gehört, sodass eine potentielle Nutzung von Fructose als Energiequelle durch Knorpelzellen wahrscheinlich ist (Ohara *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2003). **Dennoch ist Fructose bislang in einschlägiger Literatur nicht explizit als chondrozytäres Energiesubstrat beschrieben worden.** In der Kultivierung anderer Zellen erwies sie sich jedoch bereits als Kohlenhydrat, das im Vergleich zu Glucose in wesentlich geringerem Umfang bzw. auf alternativen Wegen verstoffwechselt wird mit dann auch niedrigerer Lactatproduktion und höherer pH-Wert-Stabilität (Barngrover *et al.*, 1985; Boeck, 2003; Imamura *et al.*, 1982; Koolman and Röhm, 2003; Reitzer *et al.*, 1979). Glucose dagegen kann bei überschüssigem Angebot zelltoxisch wirken (Lorenzi *et al.*, 1985; Russell, 1993).

III.3.2.2 Matrixsynthese

Die Knorpelmatrix unterliegt einer ständigen Gewebedynamik auf- und abbauender Prozesse und erfüllt wichtige Funktionen: U. a. speichert sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, bestimmt durch ihre Permeabilität das zelluläre Nährstoffangebot und fungiert als Signaltransduktor für die Knorpelzellen (Buckwalter and Mankin, 1997; Stockwell, 1991). Hauptverantwortlich für Synthese, infrastrukturelle und physikochemische Merkmale und Instandhaltung sind die Chondrozyten selbst, welche sowohl in juvenilem als auch adultem Knorpel (Bonasia *et al.*, 2011) Matrixbestandteile ebenso wie die für degradative Prozesse u. a. nötigen Enzyme produzieren und sezernieren (Stockwell, 1978; Stockwell, 1991). Dabei sind sie z. B. bei der Kollagensynthese von einem adäquaten Angebot von Vorläuferproteinen und Faktoren wie atmosphärischem Sauerstoff und Vitamin C abhängig (vgl. V.1.5, Unterpunkt „Nährmedien - Vitamin C“) (Stockwell, 1978; Stockwell, 1991). Matrixabbauende Enzyme umfassen u. a. Cathepsine und Metalloproteinasen (inkl. Kollagenasen) (Stockwell, 1978; Stockwell, 1991). Weitere die Matrix, ihre Synthese oder auch eine ggf. notwendige Gewebe-Reorganisation beeinflussende Faktoren sind vielfältig und umfassen neben dem nutritiven Angebot auch zahlreiche physikalische und chemische Signale (vgl. III.3.3) (Stockwell, 1978; Stockwell, 1991).

Das biosynthetische Potential der Knorpelzellen ist bei einem partiellen O₂-Druck von anteilig 5 % am atmosphärischen Gesamtgasdruck und einem pH-Wert von 7,2 am höchsten und schon bei leichten Verschiebungen nach sauer deutlich herabgesetzt (Gray *et al.*, 1988; Qu *et al.*,

2009; Razaq et al., 2003; Schwartz et al., 1976; Wu et al., 2007). Außerdem sind Unterschiede in der Syntheseleistung zwischen den Chondrozyten der verschiedenen Knorpelschichten zu beobachten (Bos et al., 2008): So zeigen beispielsweise die Zellen der oberflächlichen Schicht die geringste Aktivität, welche auch mit dem niedrigsten Proteoglykananteil in diesem Areal der Matrix einhergeht (vgl. III.2.2) (Aydelotte and Kuettner, 1988). Adulte Chondrozyten produzieren weniger als die juvenilen Zellen wachsender Individuen (Bonasia et al., 2011; Buckwalter and Mankin, 1997). Klinisch bezugnehmend ist, wie schon in der Einführung (III.1) erwähnt, eine korrekte Matrix-, i. e. vor allem eine fehlerfreie Kollagensynthese, essentiell für das Einwachsen transplantierten Knorpels (DiMicco and Sah, 2001). Dies kann jedoch bislang kein Therapieverfahren zur Knorpelrekonstruktion leisten (Kock et al., 2012).

III.3.2.3 Zellumsatz

Chondrozyten in reifem, adultem Knorpel liegen entweder isoliert oder in isogenen Gruppen eingebettet in die Knorpelmatrix, erfüllen wahrscheinlich meist ein ganzes Menschenleben lang ihre Synthese- und Regulationsfunktionen, teilen sich jedoch nicht mehr (Buckwalter and Mankin, 1997). Eine Proliferation adulter Zellen kann nur nach Knorpelverletzungen oder i. R. einer Zellkultur aus dem Gewebeverband isolierter Chondrozyten beobachtet werden (Stockwell, 1978). Während des Wachstums dagegen sind die hohen Mitoseraten der jungen Chondrozyten essentiell für die Längenentwicklung der Röhrenknochen und ebenso für Formung und Vergrößerung des mitwachsenden Gelenkknorpels (Buckwalter and Mankin, 1997; Stockwell, 1978). Dieser expandiert sowohl durch appositionelles als auch interstitielles Wachstum (Stockwell, 1978). Von der Geburt bis zum Erreichen des Erwachsenenalters reduziert sich die Zellularität dann siebenfach (Stockwell, 1967). Eine weitere Abnahme der Zellkonzentration im Verlauf der Jahre ist typisch vor allem für mechanisch besonders beanspruchte Gelenke und beruht demnach wahrscheinlich auf pathologischen Prozessen, die Zellapoptose bzw. -nekrose nach sich ziehen (Stockwell, 1978). Apoptotische Vorgänge finden vermutlich primär im kalzifizierten Knorpel statt und stehen somit wohl in engem Zusammenhang mit lokalen knöchernen Begleitreaktionen z. B. bei osteoarthritischen Vorgängen (Walsh et al., 2003). Auch in Hinblick auf therapeutische Ansätze von Knorpeldefekten ist zu beachten, dass *in vitro* vor allem juvenile Chondrozyten der tiefen, knochennahen Knorpelzone in der Lage sind, unter Beibehaltung ihres Phänotyps zu proliferieren und somit zwecks Regeneration neues Knorpelgewebe annähernd normaler Architektur zu bilden (Bos et al., 2008).

Apoptose bezeichnet einen physiologischen Vorgang, der es jedem Gewebe ermöglicht, u. a. nicht mehr benötigte Zellen, z. B. i. R. der Embryogenese, aber auch durch Noxen vorgeschädigte Zellen geplant zu eliminieren (Kerr et al., 1972). Um dieses intrinsische Suizidprogramm von Zellen zu aktivieren, bedarf es spezifischer zellexterner und / oder -interner Signale, die ihrerseits zur Aktivierung spezifischer Cysteinproteasen, den Caspasen (Cysteinyl-aspartic proteases) führen (Adams, 2003; Cohen, 1997; Leers et al., 1999). Diese

Enzyme realisieren die Spaltung nativer intrazellulärer Proteine, wobei in den frühen Stadien der Apoptose u. a. Zytokeratine betroffen sind, im Besonderen das CK 18 (Leers et al., 1999; Schutte et al., 2004) - *in vivo* ebenso wie *in vitro* vermittelt durch die Caspasen 3, 6, 7 (Caulín et al., 1997) und 9 (Schutte et al., 2004). Mit fortschreitender Apoptose kommt eine Fragmentation der DNA hinzu (Leers et al., 1999). Die Detektion der DNA-Strangbrüche bzw. des gespaltenen Zytokeratin 18 realisieren die immunhistochemischen Methoden TUNEL (D'Lima et al., 2004; Gavrieli et al., 1992; Gobe, 2009) bzw. M30 CytoDEATH® (Leers et al., 1999), die i. R. der Auswertung der vorliegenden Studie durchgeführt wurden (vgl. V.2.3.2 bzw. V.2.3.3). Morphologische, lichtmikroskopisch distinguierbare Kennzeichen der Apoptose sind Kondensation und Fragmentation des Zellkernchromatins (Pyknose), ein generelles zelluläres Schrumpfen und die anschließende Fragmentation durch das sog. *Blebbing* mit Bildung kern- bzw. zytoplasmamembrangebundener Bläschen sowie die Formierung apoptotischer Körperchen (*apoptotic bodies*) mit partiell erhaltenen Organellen und mitunter Kernfragmenten (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009). Für eine HE-gefärbte apoptotische Zelle gilt allgemein - selbstverständlich abhängig vom Apoptosestadium -, dass sie ein geschrumpftes, kondensiertes, dunkelrotes Zytoplasma mit z. T. apoptotischen Körperchen in Form von noch dichteren und dunkleren Fragmenten, einen dunkelvioletten pyknotischen Kern und einen sie umgebenden hellen, „leeren“ Hof (Halo) aufweist (Belicza, 2009).

Im Gegensatz zur Apoptose ist Nekrose der unphysiologische, biologisch nicht vorgesehene Zelltod, bei dem es aufgrund externer physikalischer oder chemischer Schädigung zum unphysiologischen Zelluntergang kommt (Kerr et al., 1972). Nekrotische Zellen erkennt man lichtmikroskopisch an einer Schwellung des Zytoplasmas und der damit einhergehenden, wenig definierten nukleären Chromatinaggregation (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009). In späteren Stadien lassen sich zusätzlich degradierte Strukturen des Kerns, der Organellen und der Zytoplasmamembran erkennen (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009).

Bei Verlust der Zellmembranintegrität i. R. eines Zellsterbens wird u. a. LDH frei. Die in normalem menschlichem Knorpel vorkommenden Isoenzyme sind zu ca. 75 % LDH-5, zu ca. 22% LDH-4 und zu ca. 3 % LDH-3 (Weseloh and Fießelmann, 1975). Die Lactatdehydrogenase des Typs 5 funktioniert besonders gut in Geweben mit vorwiegend anaerobem Stoffwechsel, da ihre Aktivität mit steigender Konzentration von Pyruvat, welches bei der Glykolyse entsteht, zunimmt (*ibid.*). Weiterhin für anaerobes Gewebe typisch ist ein Vorherrschen von LDH-M-Unterheiten (*ibid.*).

III.3.3 Bedeutung von Zytokinen, Serum- und Zellfaktoren

Regulierende Wachstums- und weitere in Serum enthaltene Faktoren stellten sich in zahlreichen Studien als essentiell für Knorpelstoffwechsel, Matrixsynthese und -modulierung sowohl im Physiologischen als auch bei pathologischen Vorgängen heraus. So ist z. B. FGF allgemein in die Regulierung zellulärer Proliferation und Differenzierung involviert, Hydrocortison beteiligt sich an Adhäsion, Wachstum und Vermehrung von Zellen und Insulin

ist u. a. wichtig für die Glucose- und Aminosäureaufnahme in die Zelle (*Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008*). Auch extrazelluläre Glucose selbst greift regulatorisch in den chondrozytären Stoffwechsel und in die Genexpression der Knorpelzellen ein (*Mobasheri, 2012*). IGF-1, EGF, PDGF und TGF- β 1 stimulieren die Glykosaminoglykansynthese (*Ysart and Mason, 1994*). Zur TGF- β -Superfamilie gehörig stimuliert BMP-7 die Synthese der Knorpelmatrixbestandteile Hyaluronsäure und Aggrekan (*Nishida et al., 2000*). Auch Chondrozyten selbst produzieren Wachstumsfaktoren bzw. diese antagonisierende Proteine und sorgen so eigens z. B. für ihre avaskuläre Umwelt, indem sie angiogene Faktoren u. a. mittels Sekretion von TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) ausschalten (*Stockwell, 1991*). Die Knorpelzellen exprimieren darüber hinaus CD44- und Integrin-Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen mit der Extrazellulärmatrix zu kommunizieren, Änderungen in deren Architektur zu bemerken und somit die Gewebekomöostase beizubehalten (*Knudson and Loeser, 2002*). An ihre Wirkorte im Knorpelgewebe gelangen die Zytokine bzw. bleiben dort lokalisiert z. B. durch Bindung an das matrixständige Perlecan (Heparansulfat-Proteoglykan), welches somit u. a. als Degradationsprotektor fungiert (*Costell et al., 1999*). Der matrixgebundene FGF-2 ist dagegen für die Mechanotransduktion auf die Chondrozyten verantwortlich (*Vincent et al., 2007*). Reguliert wird das Milieu der Zytokine u. a. von der vorherrschenden Sauerstoffkonzentration (*Walsh et al., 2003*). Hypoxie z. B. führt u. a. zu Expression des HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*), der dafür sorgt, dass in einer anaeroben Stoffwechselsituation glykolytische Enzyme und Glucosetransportproteine in den Knorpelzellen hochreguliert werden (*Pfander and Gelse, 2007*). Auch für Veränderungen in krankhaftem Knorpel zeichnen Wachstumsfaktoren und Co. verantwortlich. Beispielsweise triggern TNF- α und IL-1 bei Arthritiden einen katabolen Knorpelmetabolismus mit konsekutiver Matrixdegradation (*Little et al., 1999; Urech et al., 2010*).

Neben dem Mediumzusatz Insulin-Transferrin-Selen (ITS) wird in der Knorpelkultur üblicherweise fetales Kälberserum (FCS) eingesetzt (*Chua et al., 2005; Moo et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2011; Sah et al., 1990; Thal et al., 1986; Yang and Barabino, 2011*), um die o. g. wichtigen Hormone, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren, Bindungs- und Transportproteine sowie diverse Kohlenhydrate, zahlreiche Aminosäuren, anorganische Salze, Vitamine, Spurenelemente und Lipoproteine zu stellen (*Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008*). Neben der ernährenden Funktion bewirkt es mechanischen Schutz durch Herabsetzung von Scherkräften (*ibid.*). Enthaltene Serumproteine (vornehmlich Albumin) verbessern die Pufferwirkung des Mediums und inaktivieren durch unspezifische Bindung toxische Stoffwechselprodukte des Kultivierten (*ibid.*). Nachteilig ist anzusehen, dass FCS keine *per se* physiologische Substanz ist und fibroblastogene Wirkung entfalten kann (*ibid.*). Außerdem können bestimmte Substanzen und trotz steriler Herstellung auch Mikroorganismen enthalten sein, deren Interaktion mit der Kultur sowie den zellulär sezernierten Stoffen schwer bzw. nicht einzuschätzen ist (*ibid.*).

IV Fragestellungen und Ziele

Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand einer statischen Kultur boviner Explantate ein geeignetes Nährmedium für die Kultivierung von Knorpel über einen längeren Zeitraum zu etablieren und dabei chondrozytäre Stoffwechselaktivität und -charakteristika zu beobachten. Unter Beantwortung der folgenden Fragen sollten somit einige der, wie eingangs (vgl. III.1) erwähnt, zahlreich vorhandenen Wissenslücken geschlossen und Grundlagen für zukünftige *In-Vitro*-Kultivierung und -Züchtung von Knorpel geschaffen werden:

1. Ist in einer statischen Kultivierung boviner Knorpel-explantate der Zusatz von FCS zum Nährmedium wirklich notwendig oder reicht ITS aus, um chondrozytäre Vitalität und Stoffwechselaktivität zu gewährleisten?
2. Eignet sich Fructose als Glucose *in vitro* ersetzendes Energiesubstrat für Knorpelzellen? Wie wirkt sich ihr Einsatz auf Überleben und Energiestoffwechsel der Chondrozyten aus? Und wird eine höhere pH-Wert-Stabilität im Kulturmedium gewährleistet während der 48 Stunden zwischen zwei Mediumwechseln aufgrund geringerer Lactatproduktion im Vergleich zur Verwendung von Glucose?
3. Sind 2 mL der eingesetzten Kulturmedien pro Explantat und 48 h ausreichend oder bringt das in 5 mL enthaltene Mehrangebot an Kohlenhydrat und anderen Nutritiven einen Überlebensvorteil? Wirkt sich die Höhe des Nährstoffangebots auf die metabolische Aktivität bovinen Knorpels aus?

V Material und Methoden

V.1 Material

V.1.1 Laborgeräte und -instrumente

Es wurden die in **Tabelle 2** alphabetisch aufgelisteten Laborgeräte und -instrumente verwendet. Standorte sowie vollständige Bezeichnungen der Hersteller bzw. Bezugsfirmen finden sich nur jeweils bei erstem Erwähnen.

Tab. 2: Verwendete Laborgeräte und -instrumente mit Bezugsquelle bzw. Hersteller

Bezeichnung u./o. Produktname	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
Analysenwaage	Scaltec Instruments GmbH, Deutschland
Autoklav, 3850 EL	Tuttnauer, USA
Autoklav, Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Deutschland
Boxen für Mikrolitergefäße	GLW Storing Systems GmbH, Deutschland
Brutschrank; HERACell 150i, CO ₂ Incubator	Thermo Scientific, USA
Coverslipping Machine RCM 7000	Medite GmbH, Deutschland
Delimiting Pen DAKO	DAKO Denmark A/S, Dänemark
Einbettautomat und Einblockstation der Serie Tissue Tek	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Feuchte Kammer	Nunc, Apogent Company, Dänemark
Gasbrenner, accu schuett phoenix	schuett-biotec GmbH, Deutschland
Heißluftsterilisator, Typ SUT 6200	Fa. Heraeus, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Firmengruppe, Deutschland
Kühlschrank, Forma Scientific	Thermo Scientific
Laborglas, Schott Duran	Schott Jenaer Glas GmbH, Deutschland
Laborwassersystem, Arium 611	Sartorius AG, Deutschland
Mikroskop, Aristomet	Leitz / Leica, Deutschland
Mikroskop, DM IL	Fa. Leica, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer, Sunrise	Tecan, Deutschland
Mikrotiterplatten-Photometer, DPC	Milenia, USA
Objektträger-Boxen und -Mappen	Fa. Ceesem, Deutschland

Tab. 2 - Fortsetzung: Laborgeräte und -instrumente

Bezeichnung u./o. Produktname	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
pH-Meter, Accumet Basic	Fisher Scientific, USA
pH-Meter, Digital 646	Knick Elektron. Messgeräte GmbH, Deutschland
Photometer, Tecan SLT Spectra	SLT Labinstruments, GmbH, Deutschland
Pinzetten, verschiedene	Fehling-Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Pipetten: Eppendorf Research; 20, 100, 200, 1000 µL, 10 mL Multipette Plus	Eppendorf AG, Deutschland
Racks, verschiedene	GLW
Rotationsmikrotom, 1515	Fa. Leitz, Deutschland
Rotationsschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Schüttler, KS-A SWIP	Edmund Bühler GmbH, Deutschland
Sterilbank, Bio-II-A, 17974	Telstar, Spanien
Sterilbank, Uniflow UV 1800	Uniequip GmbH, Deutschland
Stickstofftank, 35 HC	Taylor-Wharton Germany GmbH, Deutschland
Spülmaschine, Mielabor G7733	Miele & Cie. KG, Deutschland
Tissue Flotation Bath TFB 45	Meditate
Tissue Stainer COT 20	"
Vortexer, 34524-200	Cenco instrumenten b.v., Niederlande
Wärmeschrank, Typ ST 5028	Heraeus
Wasserbad, groß	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Wasserbad, klein; Exatherm P5 electronic julabo	Juchheim Laborgeräte GmbH, Deutschland

V.1.2 Verbrauchsmaterialien

Es wurden die in **Tabelle 3** (s. nächste Seite) alphabetisch aufgelisteten Verbrauchsmaterialien verwendet. Standorte sowie vollständige Bezeichnungen der Hersteller bzw. Bezugsfirmen finden sich nur jeweils bei erstem Erwähnen.

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle bzw. Hersteller

Bezeichnung u./o. Produktname sowie Details	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
Biopsie-Stanzen, Ø 8mm	Stiefel GmbH, Deutschland
Deckgläser, 24 x 50 mm ²	Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
Einbettkassetten Tissue-Tek Uni-Cassettes, beige	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Einmalhandschuhe, NOBAGLOVE-Vinyl bzw. -Nitril; puderfrei, versch. Größen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Deutschland
Falcon-Tubes, 15 / 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Faltenfilter, Ø 320 mm 597 ½	Schleicher & Schuell GmbH, Deutschland
Mikrolitergefäße, Safe-Lock; 2 mL	Eppendorf AG, Deutschland
Mikrotiterplatten aus Polystyrol, durchsichtig, farblos, F-Well-Bottom; 96-Well-Format	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Multiwell-Platten Cellstar TC-Platten, steril; 6- / 12-Well-Format	Greiner Bio-One
Objektträger Superfrost Gold / Superforst Ultra Plus, 25 x 75 x 1 mm ³	Menzel
OP-Handschuhe, Peha-profile plus; steril, puderfrei, versch. Größen	HARTMANN AG, Deutschland
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas; Gesamtlänge 145 mm	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
<u>Pipettenspitzen, sterile:</u> e.p.TIPS, 200 / 1000 µL / 10 mL Combitips plus, 1 / 5 / 10 mL	Eppendorf
TipOne Filter Tips, 10 / 20 / 1000 µL	Starlab GmbH, Deutschland
Präzisionstücher, Kimtech Science; 213 x 114 mm ²	Kimberly-Clark, USA
Skalpelle, Feather Disposable Scalpel; No. 22	Feather Safety Razor Co., Japan
Spritzen, Einmal-; 10 / 20 mL	Braun Melsungen AG, Deutschland
Spritzen-Vorsatz-Filter, FP Point 2-S 0,2 µm; 7 bar max.	Whatman GmbH, Deutschland
Wägeschalen, Einmal-; Rotilabo, blau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
<u>Sowie:</u> Kryoröhrchen	

V.1.3 Chemikalien

Es wurden die in **Tabelle 4** aufgelisteten Chemikalien der Qualität *pro analysi* verwendet. Die Aufstellung ist alphabetisch geordnet, Isomerie-Spezifikationen der Produkte finden dabei keine Berücksichtigung. Standorte sowie vollständige Bezeichnungen der Hersteller bzw. Bezugsfirmen finden sich nur jeweils bei erstem Erwähnen.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien mit Bezugsquelle bzw. Hersteller

Bezeichnung bzw. Produktname sowie Details ; Artikelnummer	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
Albumine Bovine Fraction V ; 11930	Serva GmbH, Deutschland
Amphotericin B (250µg/L) ; P11-001	PAA Laboratories GmbH, Deutschland
L-Ascorbic-Acid-2-Phosphate-Magnesium-Salt-n-Hydrate ; 013-12061	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan
Butan / Propan	Campingaz, Frankreich
CertiPUR pH 4,00 (20° C) ; 1.09475.0500	Merck KGaA, Deutschland
CertiPUR pH 7,00 (20° C) ; 1.09477.0500	"
CertiPUR pH 10,00 (20° C) ; 1.09438.1000	"
Citronensäure-Monohydrat ; 1.00244.0500	"
DAB-Tabletten 10mg ; D5905	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Dako Wash Buffer 10x ; S3006	DAKO Denmark A/S, Dänemark
DMEM like 31600, flüssig ; 041-96196M Spezialanfertigung	Gibco (Invitrogen, Neuseeland)
DNAse I recombinant ; 04536282001	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Earle's Salt Solution 1x w/ 2,2g/L NaHCO ₃ ; L1915	Biochrom AG, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig ; 109844	Merck
Ethanol absolut, vergällt mit Ethylmethylethylketon ; 27690	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol 70% V/V vergällt mit Methylethylketon ; 27668	"
Eukitt, quick hardening mounting medium ; 03989	Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
FCS Standard Quality ; A11-101	PAA
Formaldehyd-Lösung 3,5 - 3,7 % gepuffert ; 27244	Fischar

Tab. 4 - Fortsetzung: Chemikalien

Bezeichnung bzw. Produktname sowie Details ; Artikelnummer	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
D-(-)-Fructose, min. 99 % ; F0127	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose \geq 99,5 % ; G7021	"
L-Glutamin (200 mM) ; 25030	Gibco
Haematoxinilin nach Mayer ; 51275	Fluka
HEPES Solution 1 M ; 15630	Gibco
H ₂ O ₂ 30 % ; 1.08597.1000	Merck
ITS (67 µg/L Sodium Selenit anhydrous, 1 g/L Insuline, 550 mg/L Transferrin, 200mg/L Ethanolamine) ; 51500-056	Invitrogen, Neuseeland
Lyphochek Lactate Level 1 (4,22 mM)	BioRad, USA
Lyphochek Lactate Level 2 (1,11 mM)	"
Lyphochek LDH Level 1 (161,2 U/L)	"
Lyphochek LDH Level 2 (320 U/L)	"
Magnesiumchlorid ; 5833	Merck
Methanol abs. ; 65543	Fluka
Natronlauge c (NaOH) = 2 mol/L (2N) ; 1.09136.1000	Merck
Paraffin, Schmelzpunkt bei 56 - 58 °C, Pellets ; 17932	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , low endotoxin ; L1825	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL) ; P11-010	PAA
Proteinase K, recombinant, PCR Grade Lyophilizate from <i>Pichia pastoris</i> ; 03115879001	Roche
Salzsäure c (HCl) = 1 mol/L (1N) ; 9057.1000	Merck
Salzsäure 25 % ; 1.00316.1011	"
Sodium Bicarbonate Solution (7,5 %) ; 25080	Gibco
Titriplex III ; 731K01000718	Merck
tri-Natriumcitrat-Dihydrat ; 515A3048	"
Tris-Base ; T-1503	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ; 1.08382	Merck
Tris Ultrapure ; 22643	United States Biochemical Corp., USA
Triton X-100 ; X100	Fluka
TUNEL Dilution Buffer TDB ; 11966006001	Roche
TUNEL POD ; 11772465001	"

Tab. 4 - Fortsetzung: Chemikalien

Bezeichnung bzw. Produktname sowie Details ; Artikelnummer	Bezugsquelle bzw. Hersteller, Standort
Tween 20 SigmaUltra ; P7949	Sigma-Aldrich
Xylol Isomerengemisch ; 33817	"
Sowie: Isopropanol, Flüssigstickstoff	

V.1.4 Kits

Es wurden die in **Tabelle 5** alphabetisch aufgelisteten Kits verwendet.

Tab. 5: Verwendete Kits mit Hersteller

Produktname ; Artikelnummer	Hersteller, Standort
D-Glucose/D-Fructose, UV-Test ; 10139106035	Boehringer Mannheim / R-Biopharm AG, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit, POD ("TUNEL-Kit") ; 11684817910	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Lactate-Assay (Trinder-Reaction) ; 11822837190	"
LDH-Assay (Warburg-Reaction) ; 03002098122	"
M30 CytoDEATH, Fluorescein ; 12156857001	"

V.1.5 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Das Wasser für die Herstellung der Lösungen, Puffer, Nährmedien und weitere Indikationen wurde in einem Laborwassersystem (Arium 611, Sartorius) entionisiert und stets frisch destilliert (*aqua dest.*) verwendet.

Nährmedien

Grundlage der unterschiedlichen Nährmediumansätze bildete ein flüssiges *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM like 31600, Gibco):

- ohne Natriumhydrogencarbonat
- ohne HEPES
- ohne L-Alanyl-L-Glutamin (= GlutaMAX™)
- mit Phenolrot als pH-Indikator

Als Spezialanfertigung enthielt es außerdem folgende Komponenten nicht:

- Glucose
- L-Glutamin

Diese DMEM-Variante wurde gewählt, um die je nach Fragestellung und Versuchsanordnung zusätzlich benötigten Ingredienzien variabel sowie in der gewünschten Konzentration ergänzen zu können und um auch für Folgeversuche größtmögliche Flexibilität in der Austestung verschiedener Mediumzusammensetzungen zu haben. Im Falle des L-Glutamins

war außerdem entscheidend, dass es aufgrund seiner Instabilität in wässriger Lösung ab einer Temperatur von -10°C aufwärts zerfällt, bei 4°C eine HWZ von lediglich 3 Wochen hat (Boxberger, 2006) und somit seine längerfristige Lagerung in Lösung sinnlos macht.

Die sterilen Medium-Variationen hatten wie die Synovialflüssigkeit eines gesunden diarthrotischen Gelenks einen pH-Wert von 7,4 (van den Berg, 2003).

Die in **Tabelle 6** aufgestellten Varianten kamen zum Einsatz.

Tab. 6: Zusammensetzungen der verwendeten Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe	Konzentration
Alle	L-Glutamin	2 mM
	L-Ascorbic-Acid-2-Phosphate-Magnesium-Salt-n-Hydrate	10 mg/L
	ITS	1 % (V/V)
	Natriumhydrogencarbonat	0,15 g/L
	HEPES	10 mM
	Penicillin/Streptomycin	50.000 U/L
M1A	D-(-)-Fructose	1 g/L
M1B	D-(-)-Fructose	1 g/L
	FCS	2 % (V/V)
M2A	D-(+)-Glucose	1 g/L
M2B	D-(+)-Glucose	1 g/L
	FCS	2 % (V/V)

Im Folgenden finden sich Ausführungen zu den einzelnen zugesetzten Mediumbestandteilen zur erläuternden Begründung ihres Einsatzes und der dabei gewählten Konzentrationen. Die Aufstellung ist alphabetisch geordnet, etwaige Isomerie-Spezifikationen der Ingredienzien finden keine Berücksichtigung.

FCS:

Getreu den Fragestellungen und Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit wurde FCS den Medien M1B und M2B zugesetzt, um zu ermitteln, ob sich unter gegebenen Versuchsbedingungen der Einsatz von FCS aufgrund des Überwiegens seiner positiven Eigenschaften auf Knorpelzellaktivität und -vitalität (vgl. III.3.3) als günstig erweist oder ob ITS allein die sinnvollere Mediumsupplementierung darstellt.

Eine Konzentration von 2 % (V/V) FCS erwies sich u. a. bei Chua et al. (2005) in Kombination mit 1 % (V/V) ITS als sinnvoll hinsichtlich Stimulation chondrozytären Wachstums bei gleichzeitig geringer Dedifferenzierungstendenz und wurde auch in diesem Experiment gewählt.

Fructose:

Der unter IV formulierten 2. Fragestellung folgend wurde in Medium M1A und M1B Fructose als in Knorpelkultur fraglich brauchbares Kohlenhydrat alternativ zu Glucose benutzt, um bei gegebener Tauglichkeit als Energiesubstrat die unter Kultivierung mit Glucose beobachtete

vergleichsweise hohe Lactatakkumulation und den u. a. damit einhergehenden pH-Wert-Abfall ggf. vermeiden zu können (vgl. III.3.2.1).

Mit 1 g/L bzw. 5,5 mmol/L kam zwecks Vergleichbarkeit dieselbe Konzentration, mit der Glucose in den Medien M2A und M2B enthalten war, zum Einsatz.

Glucose:

Die eingesetzten 1 g/L bzw. 5,5 mM dieser Aldohexose gelten als für Zellen wichtigste Energiequelle (Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008) und werden in dieser Größenordnung auch in physiologischer Synovialflüssigkeit gefunden (Heywood et al., 2010).

L-Glutamin:

Als glucogene Aminosäure stellt L-Glutamin neben Kohlenhydraten eine wichtige Energiequelle für Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* dar (Rassow, 2008; Zielke et al., 1984), Chondrozyten eingeschlossen (Moreira Teixeira, 2012). Hier kam eine in Vorversuchen erprobte Konzentration von 2 mM zum Einsatz.

HEPES {2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure}:

Diese Puffersubstanz wird gemeinhin in der Kultivierung von Zellen und Geweben eingesetzt, da sie potent einen physiologischen pH-Wert aufrechterhalten kann. Die hier verwendete Konzentration von 10 mM ist Standard und Bestandteil chondrogener Medien (Gilbert et al., 2009; Khan et al., 2009).

ITS (Insulin-Transferrin-Selen):

Die Supplementierung von ITS ermöglicht es Chondrozyten, auch ohne Einfluss von FCS stoffwechselaktiv zu bleiben und unterbindet die Aktivierung von Signalübertragungswegen für Zellstressoren wie sie normalerweise in Kultivierung ohne Serum zu beobachten ist (Chua et al., 2005). Darüber hinaus verhindert ITS sowohl unter serumfreien als auch -abhängigen Konditionen Dedifferenzierungsprozesse, in deren Folge die Knorpelzellen ihren Phänotyp verlieren würden (*ibid.*).

Aufgrund dieser positiven Eigenschaften auf den chondrozytären Metabolismus sowohl in FCS-haltigen als auch -freien Medien wurden sämtliche DMEM-Varianten mit ITS ergänzt. Die eingesetzte Konzentration von 1 % (V/V) gilt als chondrogen in wie oben beschriebener Manier (Khan et al., 2009).

Natriumhydrogencarbonat:

Natriumhydrogencarbonat ist sowohl essentieller Nahrungsbestandteil aller Zellen, da diese HCO_3^- für eine Vielzahl gekoppelter Transportprozesse benötigen, als auch Substanz zur Pufferung erhöhter CO_2 -Gehalte (Lindl and Gstraunthaler, p.117-9, 2008). Unter 5-prozentiger CO_2 -Begasung bei 37°C-Inkubation wird in der Zell- und Gewebekultur standardmäßig eine NaHCO_3 -Konzentration von 2,2 g/L gewählt - vor allem, wenn hohe Proliferationsraten erwartet werden (Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008) -, um den physiologischen pH-Wert von 7,4 zu erreichen und durch die Pufferwirkung beizubehalten (Lindl and Gstraunthaler, p.117-9, 2008). Da keine CO_2 -Begasung vorgesehen war und Knorpel ein bradytrophes Gewebe ist, konnte diese Konzentrationsvorgabe auf die eingesetzten 0,15 g/L (entspricht ca. 1,8 mM)

reduziert werden, was auch die Empfehlung, bei zusätzlicher Pufferung mit HEPES Natriumhydrogencarbonat in einer Konzentration von mindestens 0,5 mM zu verwenden, berücksichtigte (*ibid.*).

Penicillin/Streptomycin:

Zwar ist bei Einsatz eines Antibiotikums stets die Gefahr einer Resistenzbildung gegeben und es zeigte sich in Vorversuchen mit zylindrigen Knorpel-Knochen-Explantaten auch ein negativer Einfluss auf die Zellproliferation, doch die antibiotische Abdeckung einer Zell- oder Gewebekultur ist dennoch generell indiziert und weltweit praktiziert, um Probenverluste durch bakterielle Kontamination zu vermeiden.

Vitamin C (L-Ascorbic-Acid-2-Phosphate-Magnesium-Salt-n-Hydrate):

Als Cofaktor verschiedener Hydroxylasen und Oxygenasen ist Vitamin C u. a. substantiell für die für Knorpelaufbau, -reparatur und -explantatintegration (*DiMicco and Sah, 2001*) benötigte Kollagensynthese (*Hauser, 2008*), indem es z. B. intermolekulare Quervernetzungen innerhalb der Kollagenstruktur ermöglicht (*Stockwell, 1978*). Durch seine antioxidative Wirkung schützt das Vitamin außerdem vor Zellschäden durch Radikale sowie bei Elektronen übertragenden biochemischen Reaktionen (*Hauser, 2008*).

Da L-Ascorbinsäure in wässriger Lösung sehr schnell oxidiert (*Feng et al., 1977*) und nur über eine HWZ von ca. 10 Minuten verfügt, wurde mit den in Vorversuchen erfolgreich erprobten 10 mg/L L-Ascorbic-Acid-2-Phosphate-Magnesium-Salt-n-Hydrate ihr stabileres Derivat verwendet, welches erst durch eine Phosphatase in die physiologisch wirksame, aber instabile Form überführt wird (*Hata and Senoo, 1989*). So wurde Vitamin C direkt vor Ort am kultivierten Knorpel aus seiner im Medium enthaltenen stabilen Form den Chondrozyten zur Verfügung gestellt und damit die Versorgung mit diesem essentiellen Coenzym für die gesamte Dauer des Versuchs gewährleistet.

Lösungen und Puffer

Die in **Tabelle 7** (s. nächste Seite) erfassten Ansätze tauchen in derselben Reihenfolge auf wie sie auch zeitlich im experimentellen Ablauf bzw. im jeweiligen Methodenprotokoll erstmalig erschienen. Eine ggf. erforderliche pH-Wert-Einstellung wurde durch Titration mit Salzsäure (1N bzw. 25 %, Merck) bzw. Natronlauge (2 N, Merck) erreicht.

Verwendete kommerziell erworbene gebrauchsfertige Lösungen und Puffer werden in der folgenden Übersicht nicht aufgeführt, sondern finden unter der Chemikalienliste in Kapitel V.1.3 (**Tab. 4**) Erwähnung.

Tab. 7: Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
Antibiotische Earle's Salt Solution; pH 7,3	Penicillin/Streptomycin Amphotericin B	500.000 U/L 4 mg/L
TUNEL-Methode		
Peroxidase-Block-Lösung	H ₂ O ₂ 30 % Methanol	3 % (V/V)
Waschpuffer	Dako Wash Buffer	1:10
Tris-HCl-Puffer; pH 7,4	Tris-Base	10 mM
Block unspezifischer Proteinbindungsstellen; pH 7,4	BSA Tris-Base	5 % (V/V) 500 mM
Proteinase-K-Puffer, pH 8, autoklaviert	Tris-Base EDTA	100 mM 50 mM
Proteinase-K-Arbeitslösung	Proteinase-K Proteinase-K-Puffer	0,05 mg/mL
Citrat-Puffer, pH 6	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	10 mM
Permeabilisierungslösung	Triton X Citrat-Puffer	0,1 % (V/V)
Waschpufferlösung	BSA PBS	5 % (V/V)
Nuklease-Puffer, pH 7,5	Tris-Base Magnesiumchlorid BSA	50 mM 10 mM 1 mg/mL
Nuklease-Arbeitslösung	DNase I Nuklease-Puffer	3000 U/L
TdT-Enzym-Ansatz	Enzymlösung, zusammengesetzt aus: <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (EC 2.7.7.31)</i> und <i>Storage buffer</i> Labellösung, zusammengesetzt aus: <i>Nucleotide mixture</i> und <i>Reaktionspuffer</i>	1:10
TUNEL-Reaktionsansatz	TdT-Enzym-Ansatz TUNEL Dilution Buffer	1:5 bzw. 1:10
Converter-POD-Verdünnungslösung	BSA PBS	1% (V/V)

Tab. 7 - Fortsetzung: Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
<u>TUNEL-Methode - Fortsetzung</u>		
Zweit-AK-POD-Ansatz	Converter-POD: Anti-Fluorescein-AK konjugiert mit Meerretich-POD Converter-POD-Verdünnungslsg	1:5
Substratlösung	DAB H ₂ O ₂ 30 % Tris-HCl-Puffer	2/3 mg/mL 0,024 %
Kern-Gegenfärbung	Haematoxin nach Mayer	20 % (V/V)
<u>M30-Methode</u>		
Peroxidase-Block	s. TUNEL-Methode	
Citrat-Puffer, pH 6	Citronensäure-Monohydrat	2 g/L
Inkubationspuffer	BSA Tween 20 PBS	1 % 0,1 % (V/V)
Waschpuffer	Tween 20 PBS	0,1 % (V/V)
Substratlösung	s. TUNEL-Methode	
<u>Glucose-/Fructose-Assay</u>		
Standards	D-(+)-Glucose bzw.	1 g/L
	D-(-)-Fructose	0,8 g/L
		0,6 g/L
		0,4 g/L
		0,2 g/L
		0,09 g/L
		0,07 g/L
		0,05 g/L
		0,03 g/L
		0,01 g/L
		0,0 g/L
	FCS	2 % (V/V)
	DMEM like 31600	

Tab. 7 - Fortsetzung: Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer

Lösung	Inhaltsstoffe	Konzentration
<u>Glucose-/Fructose-Assay - Fortsetzung</u>		
Coenzym-Gebrauchslösung (Cosubstratlösung)	Pulvergemisch, zusammengesetzt aus: - TRA-Puffer; pH ca. 7,6 - NADP, ca. 64 mg - ATP, ca. 160 mg - Magnesiumsulfat	5 g /27 mL
HK/G6P-DH-Gebrauchslösung (Enzymlösung 1)	HK/G6P-DH- Stmlsg,zusammengesetzt aus: - Hexokinase, ca. 200 U - Glucose-6-phosphat- Dehydrogenase, ca. 100 U Coenzym-Gebrauchslösung	2 % (V/V)
PGI-Gebrauchslösung (Enzymlösung 2)	PGI-Stammlösung, zusammengesetzt aus: - Phosphoglucose-Isomerase, ca. 490 U Coenzym-Gebrauchslösung	2 % (V/V)

V.1.6 Biomaterial

Der Schlachterbetrieb Manger aus Wetter in Hessen stellte die beiden intakten mit Muskulatur umschlossenen und unversehrter Gelenkkapsel ausgestatteten Schultergelenke eines eineinhalb Jahre alten Rindes der Rasse Holstein zur Verfügung. Sie waren im Bereich des oberen, d.h. gelenknahen, Humerusdrittels sowie am lateralen Skapulapart abgesetzt. Größe und Entwicklung des Tieres entsprachen der altersadaptierten Norm.

Geburtsdatum: 5. November 2008

Schlachtung: 26. Mai 2010 um 11:00 Uhr

Präparation: 26. Mai 2010 ab 12:30 Uhr, direkt nach Antransport bei Außentemperatur (ca. 20° C)

V.2 Methoden

Zum keimfreien Arbeiten standen sterile Arbeitsbänke (Telstar bzw. Uniequip) zur Verfügung, deren Arbeitsflächen vor jeder Benutzung mit 70%-igem Ethanol desinfiziert wurden. Laborglas und -geräte (Pinzetten etc.) sowie Eppendorfgeläße wurden bei 122° C und 100 kBar für 20 Minuten autoklaviert. Flüssiges wurde durch einen Spritzen-Vorsatz-Filter der Porengröße 0,2 µm (Whatman) steril filtriert oder war kommerziell erworben als Lösung,

Puffer oder Medium bereits kontaminationsfrei gebrauchsfertig. Weiterhin kamen sterile Handschuhe, OP-Kittel und Mundschutz stets zum Einsatz, wenn Asepsis gefordert war.

V.2.1 Versuchsaufbau

Das Experiment sah eine 16-tägige Kultivierung von insgesamt 96 Knorpelchips vor. Daneben gab es eine Kontrollgruppe nicht kultivierter Chips. Bei 16 Versuchsgruppen gleicher Größe war dieser Stichprobenumfang relativ gering, konnte aber aufgrund der zur Verfügung stehenden biopsierbaren Knorpelmenge nicht größer gestaltet werden und passte außerdem zum Plan, für die Auswertung nicht-parametrische statistische Tests zu verwenden (vgl. V.2.5).

Näheres zu Versuchsdurchführung und experimentellen Bedingungen im Folgenden.

V.2.1.1 Präparation der Knorpelchips

90 Minuten *post mortem* wurde mit der Präparation der zwei Muskel-Gelenk-Pakete begonnen, deren Temperatur zumindest in den tieferen gelenknahen Schichten noch der normalen Körpertemperatur eines Rindes entsprach. Es waren ubiquitär noch autonome Muskelkontraktionen zu beobachten. Zunächst wurden die von Muskulatur umschlossenen Schultergelenke jeweils 10 Minuten unter fließendem kaltem Leitungswasser abgewaschen. Anschließend wurden sie unter einer Sterilbank mit 70%-igem Ethanol (Otto Fischar) von allen Seiten eingesprüht. Letzteres wurde nach 10 Minuten wiederholt und vor der tatsächlichen Freilegung des Gelenkknorpels wurden dann weitere 10 Minuten abgewartet.

V.2.1.1.1 Freilegen und Biopsie des Gelenkknorpels

Unter streng sterilen Kautelen präparierte man mit Einmal-Skalpellen (Feather, Größe 22) zum Gelenk vor, wobei die umschließende Muskulatur sowie der tendinöse Gelenkapparat durchtrennt und zum Großteil entfernt wurde. Durch eine 2 cm lange Inzision der zuvor unversehrten Gelenkkapsel wurden mit einer Einmal-Spritze 10 mL der Synovialflüssigkeit für die spätere biochemische Untersuchung aus dem Gelenkspalt entnommen und bei -80° C eingefroren. Hiernach wurde über eine zirkumzidierende Durchtrennung der Kapsel das Gelenk vollständig eröffnet, sodass Gelenkkopf und -pfanne mit ihren kommunizierenden Knorpelflächen getrennt voneinander zur anschließenden Probengewinnung vorlagen.

Um die erforderliche Anzahl an Knorpelchips in gewünschter Form und Größe zu erhalten, wurden die zur Biopsie ausgewählten Knorpelareale zunächst mit 8 mm durchmessenden Biopsiestanzen (Stiefel) gestanzt und daraufhin mit Skalpellen unterschritten. Stanzen und Skalpelle wurden regelmäßig gewechselt sobald subjektiv die Instrumentenschärfe nachließ. So wurden unter Wahrung der Sterilität ca. 130 Zylinder mit einem Durchmesser von 8 mm biopsiert, deren Höhe je nach Gelenkflächenbereich zwischen 0,5 und 1,5 mm variierte. Es wurde darauf geachtet, die Knorpelchips vorrangig aus den zentralen, also *in vivo* höheren mechanischen Belastungen ausgesetzten Zonen zu entnehmen, da der dort zu findende

Knorpel anfälliger für z. B. traumatische Läsionen und daher vorrangig von Interesse für die unfallchirurgische Forschung ist. Doch um eine ausreichend hohe Probenzahl zu erhalten, musste auch auf die peripheren Gebiete ausgewichen werden. Vgl. **Abb. 3** und **4** s. u.

Nach der Biopsie wurden die Knorpelchips in ein 50-mL-Falcon-Tube (Greiner Bio-One) mit isotoner phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, Dulbecco; Biochrom) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} überführt.

Abb. 3: Foto eines Gelenkkopfes nach erfolgter Probengewinnung

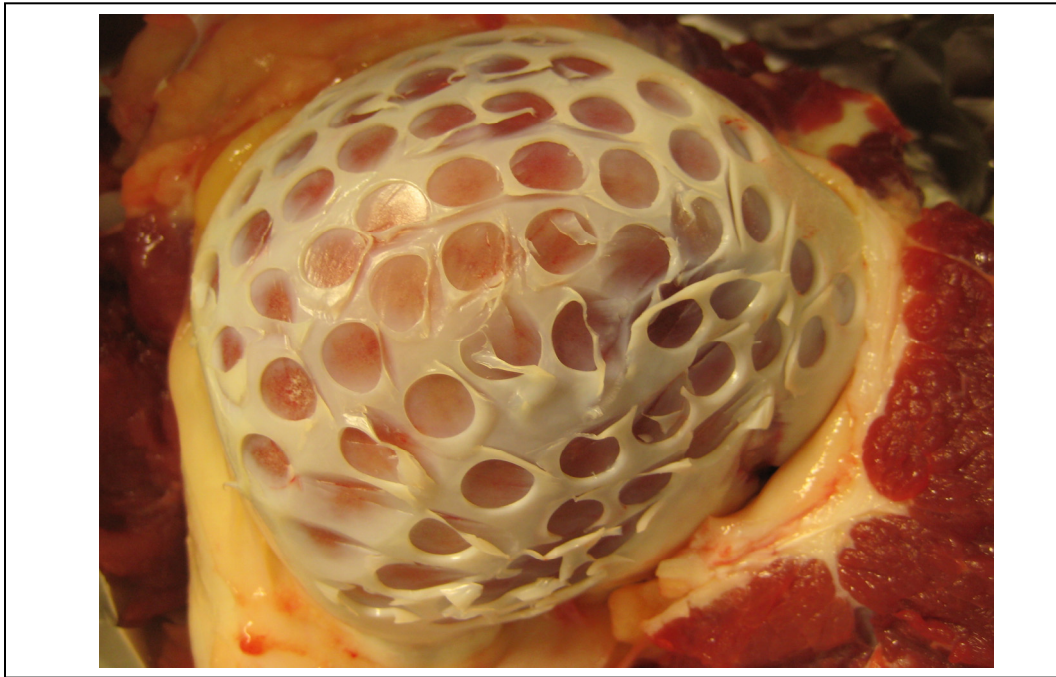
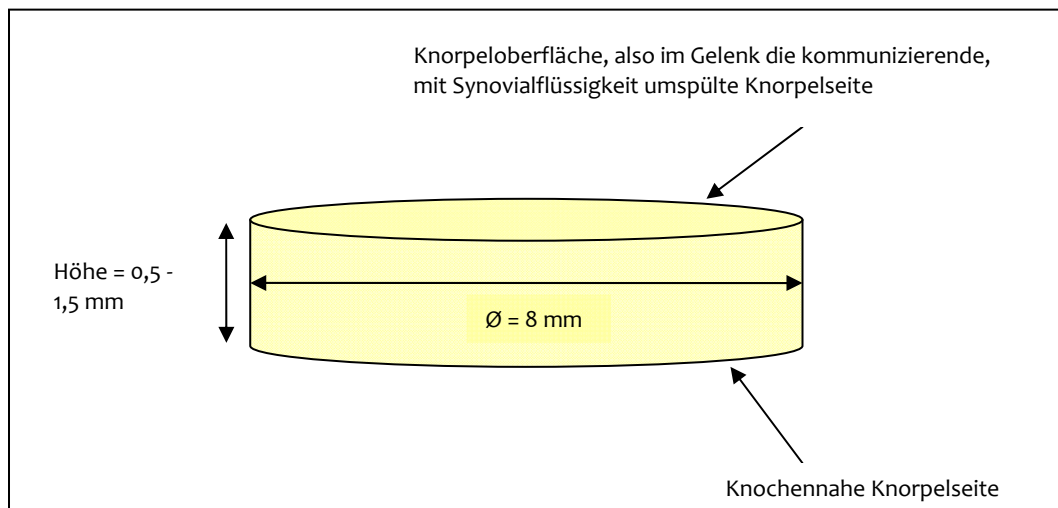


Abb. 4: Graphische Darstellung eines bioptierten Knorpelchips



V.2.1.1.2 Vorbehandlung der Explantate

Nachdem die gewünschte Anzahl an Knorpelchips gewonnen worden war, wurden die Proben dem PBS-Sammelröhrchen entnommen und unter einer Sterilbank in 150 mL, auf 37° C vorgewärmte, *Earle's Salt Solution* mit 2,2 g/L NaHCO_3 (Biochrom) überführt. Das

verschlossene Gefäß mit den Biopaten wurde daraufhin in einem beheizten Raum (Lufttemperatur 37° C) auf einem Rotationsschüttler (Heidolph) für 10 min geschwenkt. Die isotone Salzlösung wurde zweimal unter sterilen Bedingungen gewechselt, sodass die Knorpelstücke dann für je weitere 10 min in frischer Lösung auf dem Rotationsschüttler gewaschen wurden. Demnach wurden für das insgesamt 30-minütige Waschen 450 mL *Earle's Salt Solution* verwendet. Wie die später im Versuchsverlauf durchgeführten lichtmikroskopischen Kontrollen zeigten, wurde so eine fast vollständige Entfernung von Kollagenfasern und kartilaginären Zellen gewährleistet. Waschlösung war eine *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS) mit 2,2 g/L NaHCO₃, da auf dieser basalen Salzlösung mit der physiologischen Ionen- bzw. Elektrolytzusammensetzung des Extrazellularraums (*Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008*) auch die für die Kulturmedien verwendete DMEM-Variante (Gibco, like 31600) beruhte und sie somit eine äquilibrierende Funktion erfüllen konnte.

Anschließend wurde die Waschlösung durch eine EBSS gleicher Zusammensetzung ersetzt, die zusätzlich 10.000 U/L Penicillin/Streptomycin und 250 µg/mL Amphotericin B (beides: PAA) enthielt und zur antimikrobiellen Vorbehandlung 20 min ebenfalls bei 37° C auf dem Rotationsschüttler auf den Knorpelchips belassen wurde.

V.2.1.1.3 Bestimmung des Nassgewichts

Nach den o. g. Vorbehandlungsschritten wurden die Chips unter der Sterilbank einzeln unter möglichst atraumatischem Vorgehen mit einer Pinzette aus der antimikrobiellen EBSS entnommen und in sterile Einweg-Wägeschalen (Carl Roth) auf einer Analysenwaage (Scaltec Instruments) zur Bestimmung ihres Ausgangsnassgewichts platziert.

V.2.1.1.4 Gewebefixierung der Nullkontrollen

Neben den zur Kultivierung vorgesehenen Knorpelchips wurden auch 10 Nullkontrollen (fortlaufend nummeriert: 1-10) bestimmt, die sofort nach erfolgter Vorbehandlung und Nassgewichtbestimmung in Einbettkassetten (Tissue-Tek, Sakura Finetek) primär in Formaldehyd-Lösung (3,5-3,7 %, gepuffert; Fischer) zur Fixierung gegeben und nicht kultiviert wurden (vgl. Details und Erläuterungen zur gewählten Fixationsmethode unter V.2.1.3.2). Zur weiteren Gewebeaufbereitung und anschließender Paraffineinbettung wurde dann nach dem unter V.2.2 geschilderten Protokoll vorgegangen. Ebenfalls nicht am Experiment teilnehmend wurden weitere Chips in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank (35 HC, Taylor-Wharton Germany) als Ausgangsproben für spätere, damals noch geplante Western-Blot- und PCR-Untersuchungen am kartilaginären Biomaterial untergebracht.

V.2.1.2 Kultivierung

Bei jedem im Folgenden beschriebenen praktischen Versuchsbestandteil, i. e. primäre Bestückung der Plattenwells mit einem Knorpelchip, Mediumwechsel sowie mikroskopische Kontrollen, wurde stets mit der Gruppe der niedrigsten Nummer begonnen und dann nach aufsteigender Nummerierung weiter vorgegangen, sodass absolute Inkubationszeiten etc.

vergleichbar waren. Außerdem wurde sichergestellt, dass stets nur die zu behandelnde oder zu untersuchende Platte für möglichst kurze Zeit aus dem Brutschrank entfernt wurde.

V.2.1.2.1 Allgemeine Bedingungen

Die Knorpelchips wurden so in die mit den entsprechenden, 37°C-warmen Medien befüllten Wells der Multiwell-Zellkulturplatten (Cellstar TC-Platten, steril; Greiner Bio-One) gelegt, dass ihre Zylinderunterseite, also die *in vivo* knochennahe Knorpelfläche dem Plattenboden auflag. Geführt wurde die Knorpelkultur für 8 bzw. 16 Tage bei 37° C in einem Brutschrank (HERACell 150i, CO₂ Incubator; Thermo Scientific), wobei alle 48 Stunden ein Mediumwechsel stattfand. Es wurde nicht wie sonst in Zellkulturen üblich eine CO₂-Begasung vorgenommen, da dieser Versuch auch als Vorversuch diente für weitere geplante Knorpelexperimente außerhalb eines Brutschrankes, in Bioreaktoren, in deren Rahmen eine CO₂-Begasung aus Praktikabilitätsgründen nicht vorgesehen sein würde.

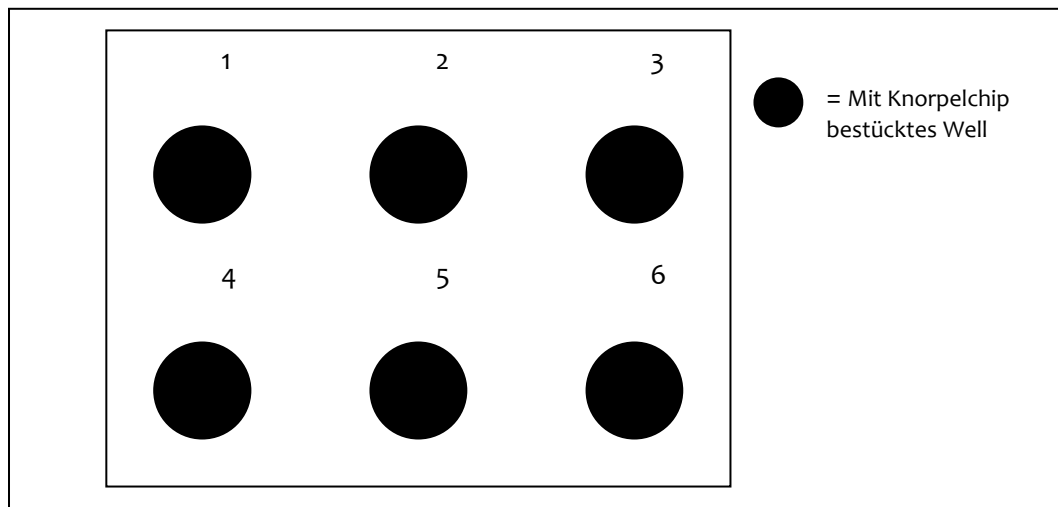
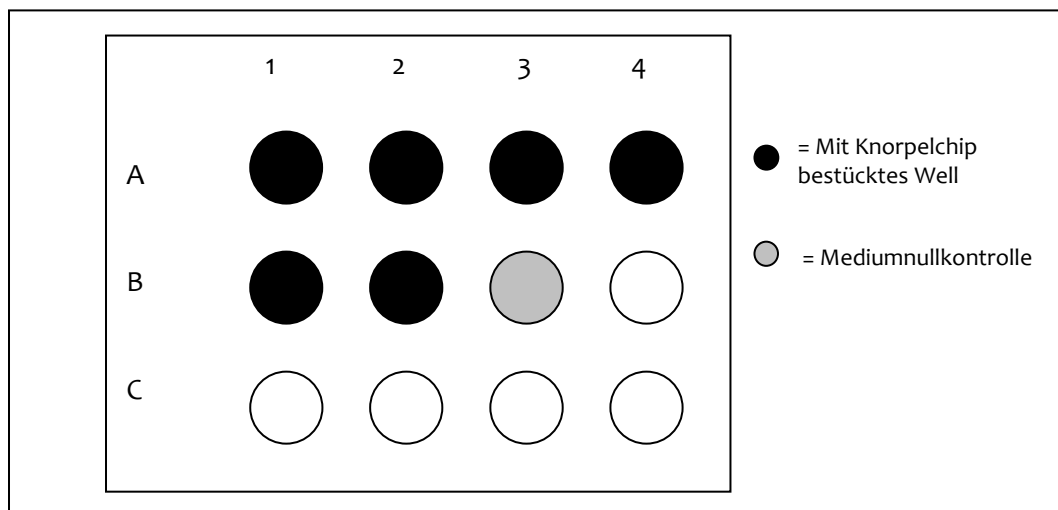
V.2.1.2.2 Versuchsgruppen

Der experimentelle Ansatz beinhaltete bei zehn sofort fixierten Nullkontrollen 96 weitere zu kultivierende Knorpelproben, welche 16 Versuchsgruppen je zu sechst zugeteilt waren.

Es wurde FCS-freies Medium mit FCS-haltigem verglichen, welchen als Energie lieferndes Kohlenhydrat entweder Glucose oder Fructose zugesetzt war, sodass insgesamt vier Mediumkonstellationen möglich waren. Die Inkubation des Knorpels mit je einem dieser vier differenten Nährmedien erfolgte dann entweder in 5 mL (6-Well-Platten) bzw. 2 mL (12-Well-Platten) der entsprechenden Lösung, sodass in beiden Plattenformaten eine vergleichbare Füllhöhe erreicht wurde: 0,521 cm in den Wells der 6-Well-Platten bzw. 0,513 cm in den bestückten Wells der 12-Well-Platten. Die so entstandenen acht unterschiedlichen Gruppen wurden nun entweder 8 oder 16 Tage lang kultiviert, sodass nach Versuchsende insgesamt 16 Gruppen zusätzlich zur Vergleichsgruppe auszuwerten waren. Vgl. folgende **Tab. 8** und **Abb. 5-7** auf den nächsten zwei Seiten.

Tab. 8: Aufstellung der verschiedenen Versuchsgruppen und ihrer jeweiligen Experimentalbedingungen

6-Well-Format, 5 mL Medium/Well		12-Well-Format, 2 mL Medium/Well	
8 d Kultivierung	16 d Kultivierung	8 d Kultivierung	16 d Kultivierung
Medium 1A (M1A) mit 1 g/L Fructose			
Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Medium 1B (M1B) mit 1 g/L Fructose und 2% (V/V) FCS			
Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8
Medium 2A (M2A) mit 1 g/L Glucose			
Gruppe 9	Gruppe 10	Gruppe 11	Gruppe 12
Medium 2B (M2B) mit 1 g/L Glucose und 2% (V/V) FCS			
Gruppe 13	Gruppe 14	Gruppe 15	Gruppe 16
Pro Gruppe 6 Elemente			

Abb. 5: Darstellung der Kulturplattenbelegung mit den Knorpelchips bei den 6-Well-Platten**Abb. 6:** Darstellung der Kulturplattenbelegung mit den Knorpelchips bei den 12-Well-Platten

Die Bezeichnung der einzelnen Chips erfolgte nach folgendem Muster:

Gruppen der 6-Well-Platten:

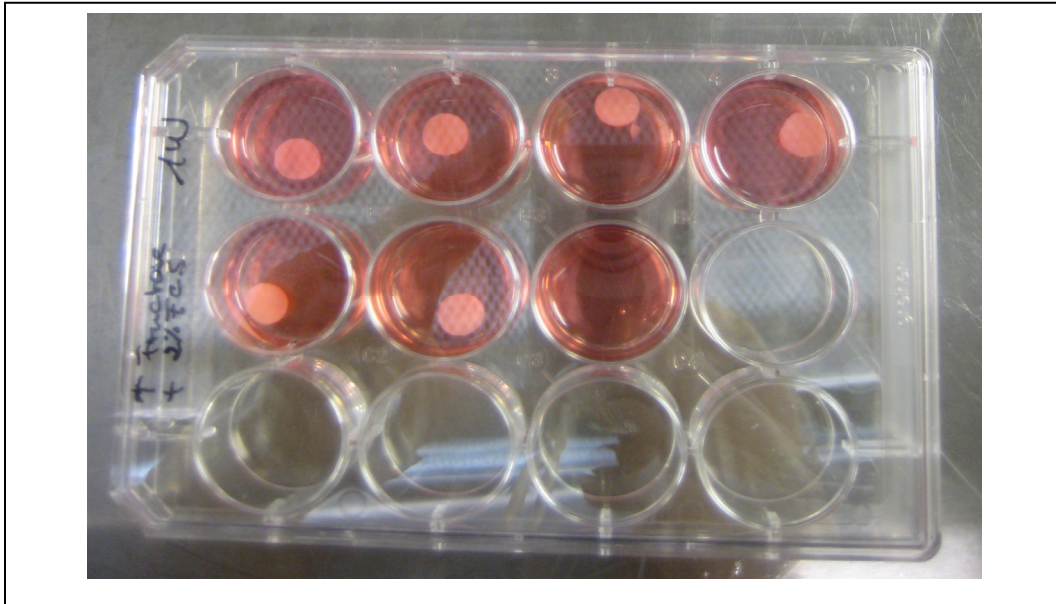
Der Chip der Gruppe x in Well y wurde mit **x.y** bezeichnet, wobei x = 1; 2; 5; 6; 9; 10; 13 bzw. 14 und y = 1; 2; 3; 4; 5 bzw. 6.

Gruppen der 12-Well-Platten:

Der Chip der Gruppe a in Well A1-4 bzw. B1/2 wurde mit **a.z** bezeichnet, wobei a = 3; 4; 7; 8; 11; 12; 15 bzw. 16 und z = 1; 2; 3; 4; 5; bzw. 6 (wobei 1-4 = A1-4 und 5/6 = B1/2).

Die Mediumnullkontrollen wurden mit **NK.MT** bezeichnet, wobei MT = Mediumtyp (M1A, M1B, M2A oder M2B).

Abb. 7: Foto der belegten 12-Well-Kulturplatte von Gruppe 7 (Fruct + FCS, 2 mL Medium/Well, 8 d Kultur), Well B3 mit Mediumnullkontrolle ohne Chip



V.2.1.2.3 Mediumwechsel

Nach diversen Vorversuchen erschien es sinnvoll, das Nährmedium alle 48 Stunden zu wechseln, um einerseits mit den angestrebten Methoden messbare metabolisch bedingte Veränderungen in der Mediumzusammensetzung zu erreichen und andererseits auch genügend Energiesubstrat konstant zur Verfügung zu stellen um so eine chondrozytäre Stoffwechselentgleisung mit eventuell konsekutiven apoptotischen Vorgängen durch Kohlenhydrat(KH-)defizit zu vermeiden. Letzteres hätte zur Verfälschung der Ergebnisse bzw. deren Interpretation führen können, da Variationen bezüglich Knorpelvitalität und -stoffwechselaktivität zwischen den einzelnen Gruppen dann kausal sowohl auf Zusammensetzungsunterschieden der einzelnen Mediumkonstellationen (i. e. bspw. Fructose vs. Glucose) als eben auch auf o. g. KH-Mangel hätten beruhen können. Wie dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, wurden beide Ziele durch das gewählte 2-tägige Wechselintervall erreicht. Zu Versuchsbeginn bzw. stets, wenn im experimentellen Verlauf aufgebraucht, wurden für jede Variante 500 mL Medium mit einem pH-Wert von 7,4 steril angesetzt. Dazu wurden ausschließlich sterile Zusätze verwendet oder etwaig nicht sterile zuzusetzende Bestandteile steril durch einen Spritzen-Vorsatz-Filter filtriert (FP Point 2-S 0,2 µm; 7 bar; Whatman). Als Basiszusammensetzung aller vier unterschiedlichen Medientypen diente eine DMEM-Variante (Gibco, like 31600), welcher L-Glutamin (Gibco), L-Ascorbic-Acid-2-Phosphate-Magnesium-Salt-n-Hydrate (Wako), ITS (Invitrogen), Natriumhydrogencarbonat (Gibco), HEPES (Gibco) und Penicillin/Streptomycin (PAA) hinzugefügt wurden. Diese Basiskombination wurde des Weiteren je nach gewünschtem Medientyp um Glucose bzw. Fructose (beide: Sigma-Aldrich) und ggf. zusätzlich FCS (Standard Quality; PAA) ergänzt (Einzelheiten hinsichtlich der verschiedenen Typen inkl. Konzentrationsangaben s. unter V.1.5 sowie V.2.1.2.2). Die fertig

zusammengestellten Medien wurden bei 4-4,5° C im Kühlschrank aufbewahrt. Ein 500-mL-Ansatz reichte im Durchschnitt für 1-2 bzw. 2-3 Bestückungen in der ersten bzw. zweiten (nur noch 50% zu versorgende Chips, vgl. **Tab. 8** unter V.2.1.2.2) Versuchswoche und wurde so bei 48-stündigem Mediumwechsel-Intervall bis maximal vier Tage nach Ansetzen aufgehoben.

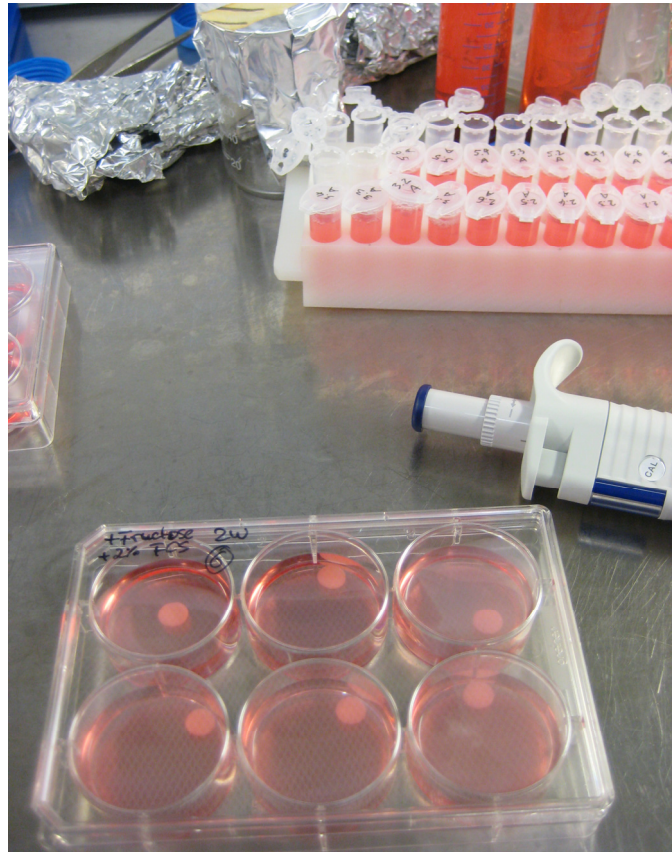
Zum Nährmediumaustausch wurden die Kulturplatten einzeln nacheinander dem Brutschrank entnommen. Unter der sterilen Arbeitsbank wurden aus jedem Well vom alten Medium 2 mL mit einer 1000-µL-Pipette (Eppendorf) entnommen und in entsprechend beschriftete Mikrolitergefäße (Eppendorf) gegeben (Details zum Beschriftungssystem s. unten). Noch im Well zurückgebliebene Überstände wurden abgesaugt und verworfen. Nun wurden die Wells mit Hilfe einer „Multipette Plus“ (Eppendorf) möglichst schnell wieder mit frischem Medium des jeweiligen Typs befüllt, welches zuvor in benötigter Menge seinem im Kühlschrank aufbewahrten 500-mL-Reservoir unter sterilen Kautelen entnommen, in ein weiteres steriles Behältnis und auf 37° C in einem Wasserbad (Juchheim) erwärmt worden war. Die nun mit frischem Medium ausgestatteten Platten wurden zurück in den Brutschrank gestellt, wobei der Mediumwechsel je Platte ca. 2-4 min in Anspruch nahm. Die in die Mikrolitergefäße abpipettierten Mediumproben wurden bei -80° C eingefroren. Zusätzlich wurden im Well B3 aller 12-Well-Platten 2 mL entsprechendes Medium als Kontrolle mitgeführt und bei jedem Wechsel mit ausgetauscht (vgl. **Abb. 6** und **7** unter V.2.1.2.2), um bei biochemischen Mediumveränderungen unterscheiden zu können zwischen Alterationen, welche auf metabolische Eigenschaften des Knorpels zurückführten und jenen, die z. B. durch Inkubation allein, Kulturbedingungen oder Kontamination verursacht waren bzw. vorgetäuscht wurden. Somit gab es bei Versuchsauswertung zu jeder 48-h-Inkubationsphase und jedem Mediumtyp, also jeder Charge, eine Kontrolle, die als Vergleich zu den Knorpel-Medien diente.

Bei jedem Mediumwechsel wurde darauf geachtet, ob und inwiefern die mit Phenolrot als pH-Wert-Indikator versetzten Medien während der vergangenen 48 Stunden einen Farbumschlag als Hinweis auf eine pH-Wert-Veränderung z. B. i. R. einer aktiven Stoffwechsellage mit reichlich Lactatanfall oder einer mikrobiellen Kontamination erfahren hatten. Auch wurde auf eine eventuelle Trübung, ebenfalls möglicher Ausdruck einer Besiedlung mit unerwünschten Mikroorganismen, geachtet.

Da die maximale Inkubationsdauer des Knorpels 16 Tage betrug, waren bei 48-stündigem Intervall insgesamt sieben Mediumwechsel und acht Mediumabpipettierungen nötig, deren Bezeichnung alphabetisch von A bis H erfolgte: der erste Wechsel (bzw. die erste Inkubationsphase) erhielt den Buchstaben „A“, das letzte Abpipettieren von Medium (bzw. die letzte Inkubationsphase) wurde mit „H“ betitelt. Zur Beschriftung der Mikrolitergefäße mit den einzufrierenden Mediumproben wurde an die Knorpelprobenbezeichnung (x.y bzw. a.z (vgl. V.2.1.2.2)) der der Mediumprobengewinnung entsprechende Großbuchstabe angehängt (Beispiel: „1.4 B“ = Medium gewonnen bei zweitem Mediumwechsel aus Well mit Knorpelprobe 1.4 (Gruppe 1, Well 4)).

Abb. 8:

Foto der 6-Well-Kulturplatte von Gruppe 6 (Fruct + FCS, 5 mL Medium/Well, 16 d Kultur) unter der sterilen Arbeitsbank während eines Mediumwechsels



V.2.1.2.4 Mikroskopische Kontrollen

Alle drei bis fünf Tage, insgesamt dreimal während des Experimentes, jeweils vor einem anstehenden Mediumwechsel, wurden die Kulturplatten an einem Lichtmikroskop (DM IL, Leica) gemustert und die Knorpelchips je für 10-30 sec daraufhin untersucht, ob von ihren Rändern ausgehend möglicherweise Chondrozyten oder Fibroblasten als dedifferenzierte Knorpelzellen ausgewachsen waren. Bei der ersten Mikroskopie wurde zusätzlich darauf geachtet, ob die Explantatränder glatt begrenzt waren oder durch die Präparation entstandene kollagene Ausfransungen aufwiesen bzw. ob in der Umgebung der Knorpelproben andere Knorpelmatrixbestandteile oder kartilaginäre Zellen zu entdecken waren, die durch die Waschgänge nicht eliminiert worden waren.

Außerdem interessierten lichtmikroskopische Anhaltspunkte für eine eventuell vorhandene Kolonisation des Mediums oder des Plattenbodens mit Mikroorganismen, z. B. Hauthefen, welche bei den Mediumwechseln versehentlich in die Kultur hätten gelangen können.

V.2.1.3 Versuchsende

Die Knorpelkultivierung endete nach 8 (Gruppen mit ungerader Nummer) bzw. 16 (Gruppen mit gerader Nummer) Tagen Inkubationszeit. Die nachstehenden Ausführungen gelten sowohl für die Bioplate, die den frühen als auch für jene, welche den späten Versuchsstopp erfuhren, da ihre Behandlung in beiden Fällen hinsichtlich durchgeführter Schritte, deren

chronologischer Abfolge und detaillierter Umsetzung identisch war. Platten mit der niedrigen Gruppennummer wurden vor den Gruppen mit höheren Nummern behandelt.

V.2.1.3.1 Bestimmung des Nassgewichts

Bei Versuchsende wurden die Platten einzeln nacheinander dem Brutschrank entnommen und die Knorpelchips wie zu Versuchsbeginn in Wägeschälchen mit 37°C-warmer PBS-Lösung auf einer Analysenwaage gewogen (vgl. V.2.1.1.3), was ca. 6 Minuten pro Platte in Anspruch nahm.

V.2.1.3.2 Gewebefixierung

Nach der Gewichtsbestimmung wurden die Knorpelbiopate in entsprechend beschrifteten Einbettkassetten bei Raumtemperatur in gepufferter Formaldehyd-Lösung (3,5-3,7 %) als erstem Schritt der Fixierung platziert, wobei wie empfohlen mindestens das 15- bis 20-fache des Knorpelvolumens Formol verwendet und eine Fixationsdauer von 24 Stunden eingehalten wurde (*Jenkins and Burg, 2003*). Diese Methode der Fixierung in neutral gepuffertem Formalin ist sowohl in der klinischen Pathologie als auch in vielen Forschungsprogrammen Standard und eignet sich auch als Vorbehandlung für die angestrebte Paraffineinbettung sowie Färbung mit u. a. Hämatoxylin und Eosin (*ibid.*).

Je Gruppe wurden 4 Chips auf diese Weise behandelt: in den Gruppen der 12-Well-Platten die Biopate a.1-4, in den Gruppen der 6-Well-Platten die Proben x.1-3 und x.6 (Beschriftungssystem s. unter V.2.1.2.2). Die weiteren Schritte der Gewebeaufbereitung und die anschließende Einbettung in Paraffin sind unter V.2.2 aufgeführt.

Die übrigen 2 Proben einer Gruppe wurden in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank (35 HC, Taylor-Wharton Germany GmbH) untergebracht.

V.2.1.3.3 Mikroskopische Kontrolle der biopatfreien Platten

Anschließend wurden die Kulturplatten, die nun nur noch das Kulturmedium des letzten Inkubationsintervalls enthielten, noch einmal mikroskopiert und auf die unter V.2.1.2.4 erwähnten möglichen Kolonisationen bzw. Kontaminationen hin untersucht.

Danach erfolgte die Gewinnung der Medienproben aus allen Wells mit der unter V.2.1.2.3 beschriebenen Methodik und deren Einfrieren in Mikrolitergefäßen.

V.2.2 Aufbereitung der fixierten Explantate

Nach 24-stündiger Fixierung wurden die Knorpelchips im Zentrum für Pathologie des UKGM (Standort Marburg) zur Einbettung in Paraffin in einem Einbettautomaten (Serie Tissue Tek, Sakura Finetek) nach üblichem Protokoll behandelt.

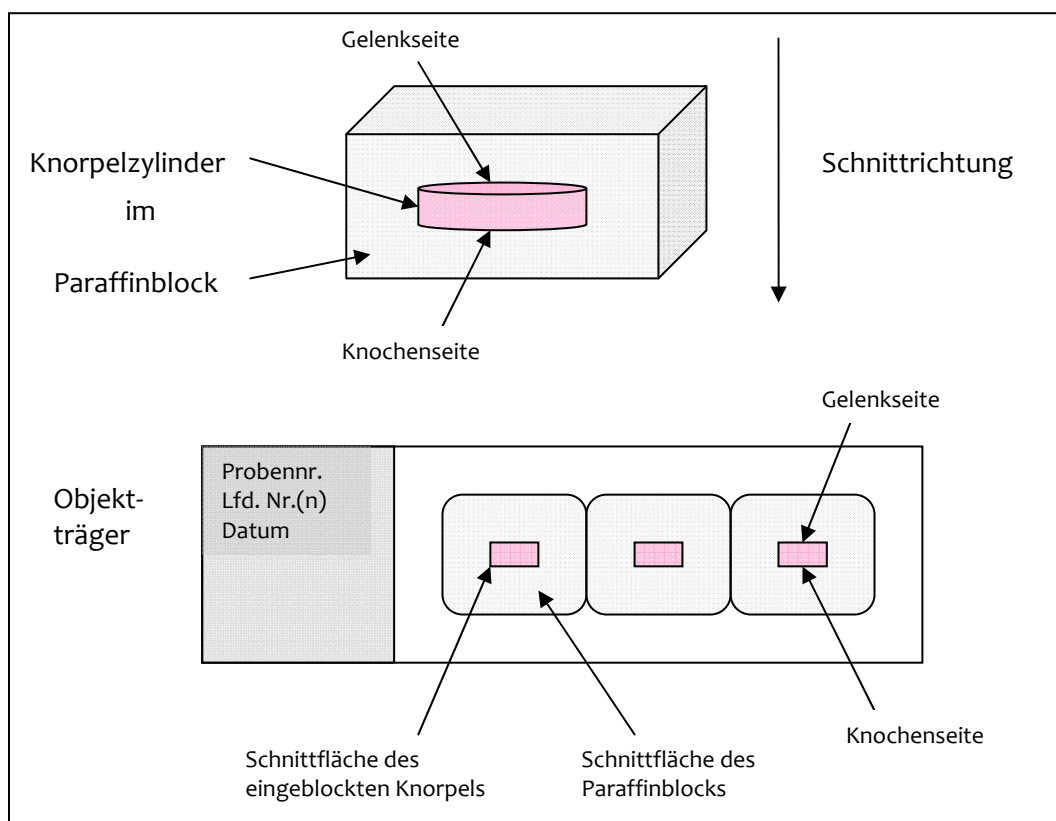
Anschließend wurde je ein Chip pro Block hochkant an der entsprechenden - ebenfalls durch die Abteilung der Pathologie zur Verfügung gestellten - Einblockstation in Paraffin eingeblockt.

Zur Anfertigung von histologisch bzw. immunhistochemisch untersuchbaren Gewebeschnitten der Knorpelbiopate verwendete man ein Rotationsmikrotom (1515, Leitz), in welches die Paraffinblöcke mit den eingeblockten Proben eingespannt wurden und zunächst so viel Paraffin abhobelt wurde bis vom hochkant eingeblockten Knorpelzylinder eine homogene rechteckförmige Querschnittsfläche angeschnitten war, die sowohl den im Gelenk kommunizierenden Knorpelabschnitt als auch den knochennahen Teil umfasste. Daraufhin wurden je Knorpelprobe ca. 5-15 Schnitte pro Biopat mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Von der Klinge des Mikrotommessers wurden die Paraffinschnitte mithilfe eines angefeuchteten Pinsels in ein mit 40° C warmem destillierten Wasser gefüllten Wasserbad (Tissue Flotation Bath TFB 45, Medite) gebracht, wo sie auf der Wasseroberfläche schwimmend zur Gewebestreckung 5-10 Minuten verweilten. Anschließend wurden bis zu vier Schnitte einer Probe gleichzeitig mit einem Objektträger (Superfrost Gold bzw. Superforst Ultra Plus, 25 x 75 x 1 mm³; Menzel) aus dem Bad gefischt, wobei sie auf dem Objektträger meist mittig platziert zu liegen kamen. Die Objektträger wurden dann für 24 h in einem Objektträgergestell im Wärmeschrank (Typ ST 5028, Heraeus) bei ca. 56° C aufbewahrt, sodass es zum Anschmelzen des Paraffins und damit besseren Haftung des Knorpelgewebes am Objektträgerglas kam.

Die Beschriftung der Objektträger umfasste an erster Stelle die Probennummer (x.y bzw. a.z, vgl. V.2.1.2.2 hinsichtlich Biopatbezeichnungssystem), es folgten laufende Nummer(n) der Gewebeschnitte und Erstellungsdatum.

Vgl. folgende **Abb. 9**.

Abb. 9: Grafik zur Schnittpräparation von Paraffinschnitten und deren Platzierung auf Objektträgern



V.2.3 Histologische und immunhistochemische Verfahren

V.2.3.1 HE-Färbung und histomorphologischer Score

Als Routinefärbung der Wahl für eine gute histologische lichtmikroskopische Beurteilbarkeit der meisten Gewebe, so auch von Knorpel (*An and Gruber, 2003*), wurde die Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung mit Eosin und Hämalun nach Mayer gewählt, bei welcher der saure Farbstoff Eosin für die rote Anfärbung basischer Gewebestrukturen wie Zytoplasma, Knorpelgrundsubstanz und Kollagenfasern i. A. sorgt. Hämatoxylin, bzw. sein Derivat Hämalun, mittlerweile ubiquitär verwendet und als Variante nach Mayer u. a. seit 1989 von Romeis als Standard zur histologischen Gewebeaufarbeitung empfohlen, führt als Gegenfärbung zu Colorierung saurer Bestandteile, vor allem der Zellkerne, in blau (*Mulisch and Welsch, 2010*).

In praxi wurden auf Objektträgern platzierte Gewebeschnitte aller Knorpelproben im Zentrum für Pathologie des UKGM (Standort Marburg) in einem Färbeautomaten nach einem Standardprotokoll gefärbt. Die HE-gefärbten Schnitte dienten dann der Erlangung eines histomorphologischen Überblicks und vor allem der Beurteilung der Zellvitalität mit Hilfe eines Scores, für den die Knorpelzellen wie folgt kategorisiert wurden (vgl. auch **Abb. 10 - 15** s. nächste Seite):

- „Vitale Zelle“: auch Zellen mit zwar dunkelrotem Zytoplasma als möglichem Apoptosezeichen, jedoch normal gefärbtem und strukturiertem Kern
- „Apoptotische Zelle“: Kern geschrumpft / fragmentiert, dunkelviolett; Zytoplasma dunkelrot; apoptotische Körperchen; ggf. heller Halo
- „Nekrotische Zelle“: Zelle und Kern geschwollen, Zytoplasma aufgehellte, insgesamt ballonartiges Aussehen

Zellen, die entweder aufgrund des Bildrandes oder der Ebene (leere Lakune) nur angeschnitten waren, wurden nicht miterfasst.

Vgl. III.3.2.3 hinsichtlich histomorphologischer Merkmale apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in der HE-Färbung.

Abb. 10 - 15: Fotografierte mikroskopische Bildausschnitte HE-gefärbter Gewebeschnitte zur Veranschaulichung der Kategorien des histomorphologischen Scores

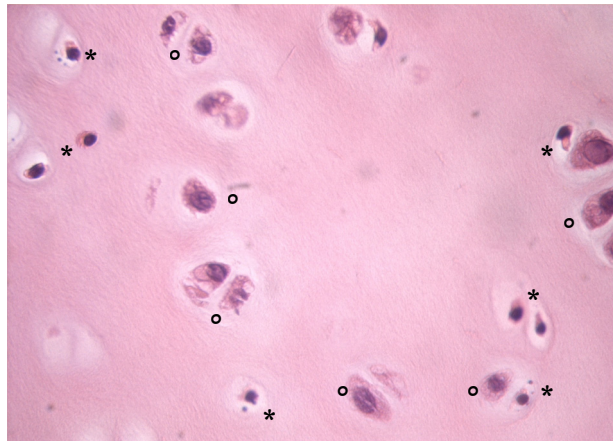


Abb. 10: Vitale (°) neben apoptotischen (*) Zellen; Chip 15.1 (Gluc + FCS, 2 mL Medium/Well, 8 d Kultur), 630-fache Vergrößerung

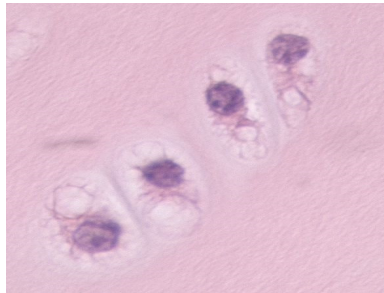


Abb. 11:

Vitales Chondron mit histomorphologisch normalen Zellen; Kontrolle (nicht kultiviert), 630-fache Vergrößerung (digital vergrößerter Ausschnitt)

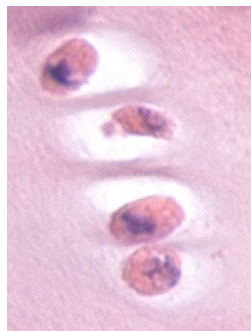


Abb. 12: Apoptotisches Chondron, geschrumpfte Zellen mit hellem Halo, dunkelvioletten, beginnend fragmentierten Kernen und intensiv roten Zytoplasmen; Chip 13.3 (Gluc + FCS, 6 mL Medium/Well, 8 d Kultur), 630-fache Vergrößerung (digital vergrößerter Ausschnitt)

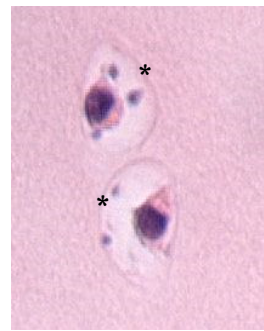


Abb. 13: Apoptotische Zellen mit kondensierten Kernen und apoptotic bodies (*); Chip 2.1 (Fruct, 6 mL Medium/Well, 16 d Kultur), 400-fache Vergrößerung (digital vergrößerter Ausschnitt)



Abb. 14: Nekrotische Zelle (ballonartig geschwollen); Chip 2.1 (Fruct, 6 mL Medium/Well, 16 d Kultur), 400-fache Vergrößerung (digital vergrößerter Ausschnitt)

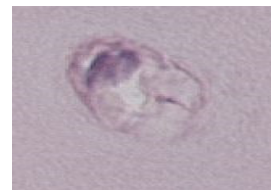


Abb. 15: Nekrotische Zelle; Chip 10.6 (Gluc, 6 mL Medium/Well, 16 Tage Kultur), 400-fache Vergrößerung (digital vergrößerter Ausschnitt)

Das Auszählen der Knorpelzellen und deren Einordnung in die drei Kategorien erfolgten mit Hilfe des PC-Programms „Image-Pro 6.2“ an abfotografierten mikroskopischen Bildern in 400-facher Vergrößerung. Sieben auszuwertende Ausschnitte waren dazu von M. Kratz (MTA) an einem Mikroskop mit angeschlossener Kamera (Aristomet, Leitz/Leica) durch blindes Verschieben des Objektträgers an pro Knorpelchip je einem gefärbten Gewebequerschnitt ausgewählt und aufgenommen worden, ohne dass der Assistentin dabei die entsprechende Probenzuordnung bekannt gewesen wäre. Die ursprüngliche Objektträgerbezeichnung war zuvor überklebt und mit einer laufenden Nummer 1-68 (4 Proben je Gruppe 1-16, zusätzlich 4 Kontrollen) versehen worden. Die Bilddateien wurden dann unter einem Titel bestehend aus eben dieser laufenden Nummer und einem laufenden Buchstaben a-g (sieben Bilder pro Probe) gespeichert. Anschließend wurden sie manuell mit oben erwähnter Software ausgewertet, wobei jede erfasste Zelle mit einem ihrer Kategorie entsprechenden *Tagpoint* versehen wurde und die jeweiligen Anzahlen zeitgleich in einer Excel-Tabelle als Summen gespeichert wurden. Erst nach Abschluss des Erfassens wurden die Daten den jeweiligen Knorpelbiopaten zugeordnet.

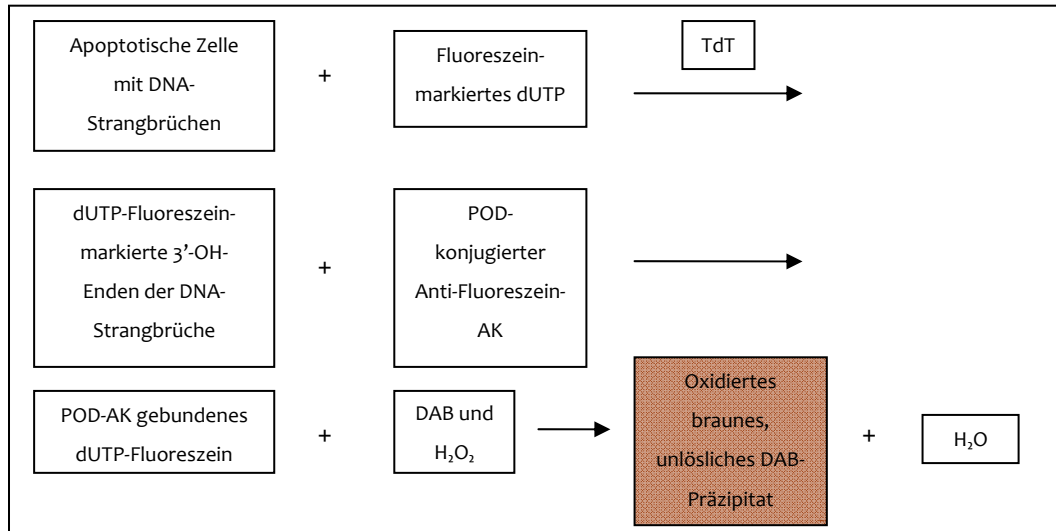
V.2.3.2 TUNEL

Die TUNEL-Methode wurde 1992 von Gavrieli *et al.* als erstmals auch an auf Objektträgern platzierten Gewebeschnitten anwendbares Verfahren zur spezifischen *In-Situ*-Detektion von DNA-Strangbrüchen beschrieben, welche u. a. in den Kernen von Zellen zu finden sind, die sich in Vorbereitung für den programmierten Zelltod befinden bzw. die Apoptose bereits durchlaufen haben (vgl. III.3.2.3). Das Akronym TUNEL steht dabei für die englische Kurzbeschreibung der Methode: *Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyUridine triphosphate (dUTP) Nick End Labelling*.

Der Assay kann in Zellen vieler Organe und Gewebe, inklusive Knorpel, *Nuclei* mit DNA-Doppel- oder Einzelstrangbrüchen markieren, indem an die freien 3'-Hydroxy-Enden der DNA-Fragmente das Nukleotid Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP) mit katalytischer Hilfe des Enzyms Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) bindet (D'Lima *et al.*, 2004; Gobe, 2009). Im verwendeten, für Formalin-fixierte Gewebeschnitte geeigneten Kit von Roche (*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD) war das dUTP fluoreszenzmarkiert, sodass zur Konvertierung in ein kolorimetrisches *Labelling* Peroxidase(POD)-konjugiert ein Anti-Fluoreszein-Antikörper(-AK), genauer sein Antigen-bindendes Fragment (Fab-Fragment vom Schaf; TUNEL-POD, Roche), zum Einsatz kam, der nach immunhistochemischem Prinzip die lichtmikroskopische Auswertung der TUNEL-Methode ermöglichte. Bei diesem Prinzip werden nach der Bindung des POD-konjugierten Antikörpers an das Fluoreszein des markierten, durch die TdT-Katalyse bereits an die DNA-Fragmente gebundenen dUTPs 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂ auf die Gewebeschnitte gegeben (Krieg and Halbhuber, 2010). H₂O₂ ist das Substrat der POD und bei der enzymatischen Reaktion werden Protonen frei, die das vorher fast farblose Chromogen DAB oxidieren und so vor Ort bei den DNA-Strangbrüchen in ein unlösliches

braunes Präzipitat überführen, welches die TUNEL-positiven Zellen für lichtmikroskopische Untersuchungen sichtbar macht (*ibid.*). Vgl. auch folgende **Abb. 16**.

Abb. 16: Schematische Darstellung des immunhistochemischen Prinzips der TUNEL-Methode, (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009; Krieg and Halhuber, 2010)



Zur Erstellung von Positiv-Kontrollen wurden zeitlich vor der eigentlichen TUNEL-Reaktion einige Gewebeschnitte der nicht kultivierten Nullkontrollen mit DNase I (= Nuklease; Roche) behandelt, welche artifiziell, d. h. nicht physiologisch entstandene, DNA-Strangbrüche in Zellkernen setzt, sodass diese Zellen bei Realisierung der TUNEL-Reaktion *lege artis* dann in jedem Fall TUNEL-positiv erscheinen. Für die Negativkontrollen wurden ebenfalls Knorpelchip-Nullkontrollen verwendet, die ausschließlich mit dUTP-Fluoreszein ohne das TdT-Enzym inkubiert wurden und somit als Kontrollvertreter der TUNEL-Negativität fungierten. Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden abgesehen von den beschriebenen Besonderheiten exakt wie alle anderen Gewebeschnitte behandelt. Die im Einzelnen nicht genannten Methodenschritte folgten Herstellerangaben.

V.2.3.3 M30 CytoDEATH®

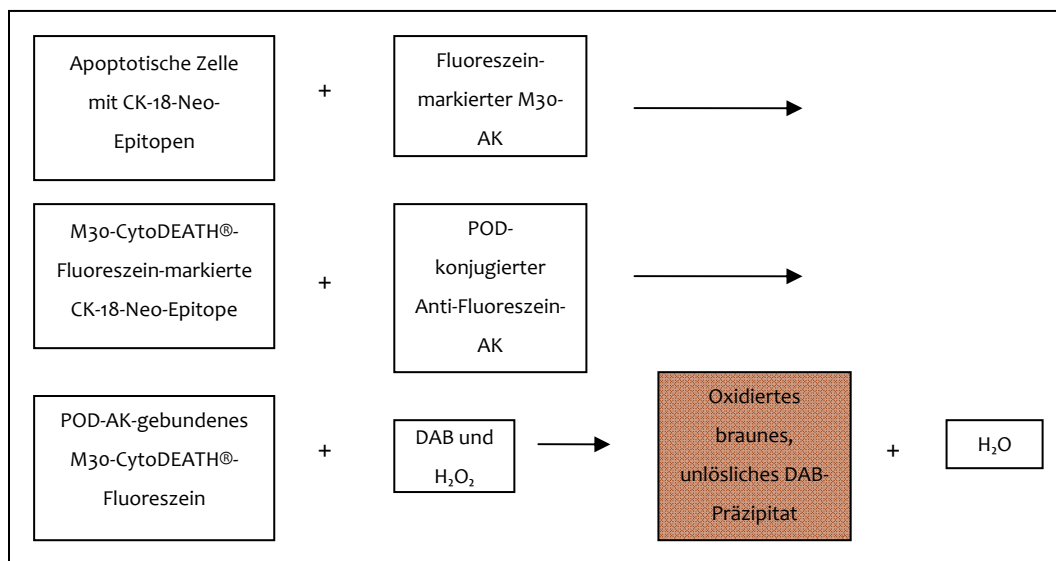
Als Alternative zur TUNEL-Methode (vgl. VI.1.1.3 und VII.1.1) wurde zur Detektion von apoptotischen Zellen das ebenfalls immunzytochemische M30-Verfahren gewählt und ein entsprechendes Kit von Roche verwendet:

Hierbei erkennt der Fluoreszein-markierte M30-CytoDEATH®-Antikörper(-AK) (Maus IgG, monoklonal, Klon M30) spezifisch ein Neo-Epitop im Zytokeratin 18 (CK 18), das CK-18-Asp396-Ne (M30) (Ausch et al., 2009), welches ausschließlich im Zytoplasma (früh-)apoptotischer Zellen auftritt und einem Caspase-Spaltlocus entspricht (vgl. III.3.2.3) (Leers et al., 1999; Schutte et al., 2004). Apoptotische Zellen zeigen bereits auf einer sehr frühen Stufe des programmierten Zelltodes M30-Positivität und damit zu einem Zeitpunkt, zu dem die TUNEL-Methode noch negative Ergebnisse liefern würde, da diese die erst in späteren Stadien auftretenden DNA-Strangbrüche detektiert (vgl. III.3.2.3). Nekrotische und vitale Zellen, beide

nur mit ungespaltenem CK 18 (M65) (Ausch et al., 2009), werden dank der hohen Spezifität des M30-Antikörpers nicht markiert (Leers et al., 1999). Das Verfahren wird in einschlägiger Literatur als für an Formalin-fixiertem und anschließend Paraffin-eingebettetem Biomaterial etablierte Methode beschrieben, eignet sich für Gewebeschnitte und passte daher sehr gut zum vorliegenden Versuchsaufbau (Leers et al., 1999; Schutte et al., 2004; Yu et al., 2001).

Analog zur oben beschriebenen TUNEL-Immunhistochemie wurde wiederum der POD-konjugierte Anti-Fluoreszein-AK (= TUNEL-POD; Roche) als Zweitantikörper in Verbindung mit H_2O_2 (Merck) und DAB (Sigma-Aldrich) verwendet um die Auswertung lichtmikroskopisch möglich zu machen (vgl. V.2.3.2). Vgl. folgende **Abb. 17**.

Abb. 17: Schematische Darstellung des immunhistochemischen Prinzips der M30-CytoDEATH®-Methode, (Krieg and Halbhuber, 2010; Leers et al., 1999)



Zur Etablierung der Methode an bovinem Knorpel wurden als Positiv- sowie Negativkontrollen Gewebeschnitte eines Paraffin-eingebetteten Glioblastoms genutzt, welche vom Institut der Chirurgischen Forschung der Universität Marburg zur Verfügung gestellt wurden. An diesem Material war das Verfahren mit demselben AK (M30 CytoDEATH®; Roche) schon erfolgreich durchgeführt worden. Darüber hinaus zeigt ein Glioblastom generell aufgrund seines enormen Zellumsatzes Zellen in allen Entwicklungsstadien, sämtliche Stufen der Apoptose eingeschlossen, sodass es sich hervorragend als Positivkontrolle eignete. Die Negativkontrolle wurde wie alle anderen Proben behandelt, der Erst-AK M30 jedoch weggelassen.

Es ist zu erwähnen, dass nach erfolgter Methoden-Etablierung nicht zu jedem Paraffin-eingebetteten, inkubierten Knorpelchip je ein Gewebeschnitt (i. e. aus jeder Experimentalgruppe 4 Schnitte) dem M30-CytoDEATH-Verfahren unterzogen wurde, sondern aus jeder Gruppe (1-16) z. T. nur ein bis zwei Proben zusätzlich zu 4 Kontrollen (nicht kultivierte Chips) dazu ausgewählt wurden. Dies waren: Kontrollen 1, 5, 9, 10; aus den Gruppen 1, 3, 5-8, 10, 12 und 16 je die Proben $_{-1/2}$ (wobei $_{-}$ = Gruppennummer), weiterhin die Proben 13-15.1, 2.1-3/6, 4.1/4, 9.1/6 und 11.1-4.

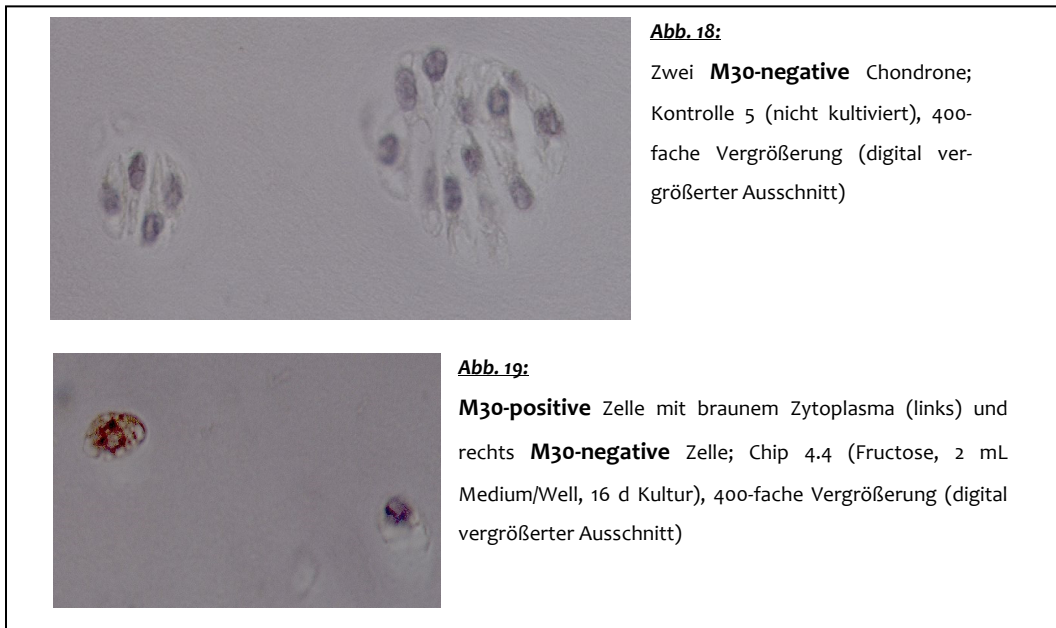
Die Einzelheiten der an der genannten Probenauswahl durchgeführten Methode finden sich in folgendem Protokoll in **Tabelle 9**. Die Zusammensetzungen der erwähnten Lösungen finden sich mit allen Details unter V.1.5 (Lösungen und Puffer; **Tab. 7**).

Tab. 9: Protokoll der M30-CytoDEATH®-Methode

1.	Entplasten <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>2 x 5 min</u> Xylol ▪ <u>2 x 5 min</u> 96 % Ethanol ▪ <u>1 x 5 min</u> 70 % Ethanol ▪ <u>1 x 10 min</u> Methanol / H₂O₂ (3%) bei 20° C ▪ <u>1 x 10 min</u> <i>aqua dest.</i>
2.	Exponierung des Antigens (CK-18-Neo-Epitop) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Citrat-Puffer-Behandlung: OT in nicht mehr kochenden Puffer platzieren, bei 750 W in der Mikrowelle zum Kochen bringen, dann bei 100 W <u>15 min</u> warm halten ▪ <u>5 min</u> bei ca. 20° C abkühlen lassen ▪ <u>3 x</u> mit PBS spülen + <u>1 x 2 min</u> PBS ▪ <u>10 min</u> Block mit Inkubationspuffer bei ca. 20 ° C
3.	AK-Behandlung mit M30 CytoDEATH® <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>1 h</u> AK-Arbeitslösung (AK-Lieferlösung 1:400 verdünnt) bei ca. 20° C in feuchter Kammer ▪ <u>3 x 30 x</u> in Waschpuffer dippen
4.	Behandlung mit Zweit-AK (TUNEL-POD) <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>30 min</u> bei 37° C in feuchter Kammer unverdünnt ▪ <u>3 x 30 x</u> in Waschpuffer dippen
5.	Färbungsentwicklung mit DAB <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Ca. 3-5 min nach Augenmaß</u> Substratlösung bei RT ▪ Farbreaktion stoppen durch <i>aqua dest.</i> aus Spritzflasche
6.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>4 min</u> bei RT Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer ▪ <u>10 min</u> bläuen mit Leitungswasser
7.	Entwässern <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>1 x 2 min</u> 70 % Ethanol ▪ <u>1 x 2 min</u> 85 % Ethanol ▪ <u>1 x 3 min</u> 96 % Ethanol ▪ <u>2 x 5 min</u> abs. Ethanol (vergällt) ▪ <u>2 x 5 min</u> Xylol
8.	Eindeckeln mit Deckglas und Eukitt® (Fluka), Beschriftung der OT (Datum, Verdünnungen etc.)

Als M30-positiv wurden bei der Auswertung Zellen mit einer zumeist homogenen Braunfärbung des gesamten Zytoplasmas gewertet, als negativ galten alle Zellen mit farblosem, allenfalls dezent hellblauem Zytoplasma. Die Zellkerne waren in allen Chondrozyten durch die Behandlung mit Hämatoxylin nach Mayer meist blau (vgl. V.2.3.1). Vgl. auch folgende **Abb. 18 / 19**.

Abb. 18 / 19: Fotografierte mikroskopische Bildausschnitte M30-CytoDEATH®-behandelter Gewebeschnitte zur Veranschaulichung der Kategorien „M30-negativ“ (= vital) und „M30-positiv“ (= früh-apoptotisch)



Das Erfassen des Anteils M30-positiver bzw. -negativer Zellen erfolgte wiederum mit dem an einen PC angeschlossenen Mikroskop (Aristomet, Leitz/Leica; vgl. 2.3.1) manuell am Bildschirm. Pro M30-CytoDEATH®-behandeltem Gewebeschnitt wurden vier - durch blindes Verschieben des Objektträgers gewählte - mikroskopische Ausschnitte in 400-facher Vergrößerung in je einer Schärfeebene beurteilt. Mit dem Programm „Image-Pro 6.2“ wurden die bewerteten Chondrozyten entweder in der Kategorie „M30-positiv“ oder „M30-negativ“ erfasst.

V.2.4 Biochemische Analysen der Medienüberstände

V.2.4.1 pH-Wert-Bestimmung

Um u. a. die pH-Wert-Stabilität des Mediums während der Knorpelkultivierung zu untersuchen, wurden nach Versuchsende die pH-Werte aufgetauter Aliquote sämtlicher Mediumproben, die bei den Mediumwechseln gewonnen worden waren, sowie der Synovialflüssigkeit, welche zu Versuchsstart aus dem Gelenkspalt abpipettiert und eingefroren worden war, bestimmt. Dazu wurde das verwendete digitale pH-Meter (Knick) zuvor mit CertiPUR® (pH 4,00; 7,00 und 10,00 (20° C); Merck) geeicht.

V.2.4.2 Kohlenhydratstoffwechsel

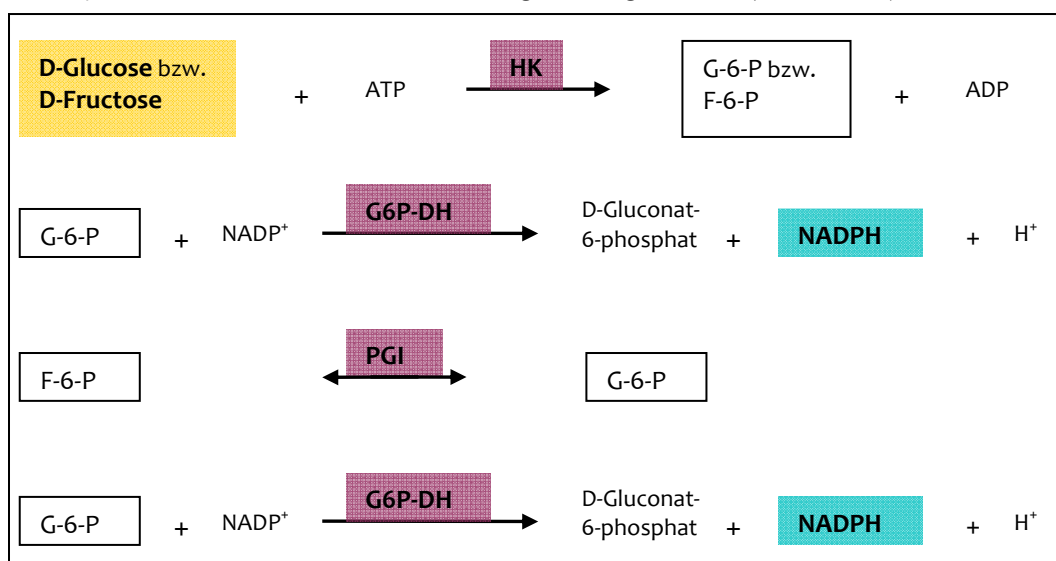
V.2.4.2.1 Glucose-/Fructose-Assay

Zur Bestimmung des Glucose- bzw. Fructosegehalts von Mediumproben und Synovialflüssigkeit wurde das Kit „D-Glucose/D-Fructose; UV-method“ von Boehringer Mannheim/R-Biopharm verwendet, welches prinzipiell sowohl für wässrige Lösungen geeignet ist, die D-Glucose und D-Fructose enthalten, als auch für solche, die nur eines dieser beiden Kohlenhydrate aufweisen.

Es beruht auf folgenden Reaktionsschritten (vgl. auch **Abb. 20** s. u. und Methodenprotokoll in **Tab. 10** s. nächste Seite):

D-Glucose und D-Fructose werden durch das Enzym Hexokinase (HK) und sein Coenzym Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) und D-Fructose-6-phosphat (F-6-P) phosphoryliert (Schmidt, 1961). Gleichzeitig entsteht Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (*ibid.*). G-6-P wird dann von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert, sodass reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) entsteht (*ibid.*). Die gebildete NADPH-Menge ist der Menge an D-Glucose in der Messprobe äquivalent (*ibid.*). NADPH ist Messgröße und wird bei Verwendung eines Spektralphotometers (hier: Tecan SLT Spectra, SLT Labinstruments) im Absorptionsmaximum bei 340 nm über die Zunahme der optischen Dichte (ΔOD) im Vergleich zur „Baseline“-Messung bestimmt (*ibid.*). Nach Ablauf der letztgenannten Reaktion wird F-6-P durch die Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in G-6-P überführt, welches wie zuvor mit NADP reagiert zu D-Gluconat-6-Phosphat und dem photometrisch messbaren NADPH (*ibid.*). Das nun neu - zusätzlich zum „Glucose-NADPH“ - gebildete NADPH ist wiederum mengenäquivalent zum D-Fructosegehalt der Probe und wird als ΔOD im Vergleich zur „Glucose“-Messung festgestellt (*ibid.*).

Abb. 20: Chemische Reaktionsgleichungen, auf welchen der verwendete Assay zur quantitativen Bioanalyse von D-Glucose und D-Fructose in wässrigen Lösungen basiert; (Schmidt, 1961)



Bei der laborinternen Etablierung der Methode für das 96-Well-Mikrotiterplatten-Format (Polystyrol, F-Wells, durchsichtig, farblos; Nunc) wurden in verschiedenen Vorversuchen mit unterschiedlichen Glucose- und Fructosekonzentrationen bzw. Unterschieden in der verwendeten Probenmenge das nötige Verhältnis von Zucker(n) zur Menge der zugegebenen Substrat- und Enzymreagenzien bestimmt. Es sollte sowohl der Endpunkt der Enzymkinetik, i.e. keine weitere Zunahme der optischen Dichte (OD) aufgrund abgeschlossener Metabolisierung der gesamten KH-Menge durch die zugesetzten Enzyme und Cosubstrate in einem noch nicht saturierten Bereich als auch eine ausreichend große OD-Änderung (Δ OD) für eine zuverlässige Mengenbestimmung erreicht werden. Schlussendlich entschied man sich bei einer maximal möglichen KH-Konzentration von 1 g/L Glucose bzw. Fructose für folgende in die 96-Well-Mikrotiterplatten zu pipettierenden Mengen, wobei der enzymkinetische OD₃₄₀-Endpunkt der NADPH-Bildung je nach 300 Sekunden (5 min) erreicht war:

- 10 µL Probe (Medium, Synovialflüssigkeit bzw. Standard)
- 100 µL Cosubstratlösung (2,37 mg/mL bzw. 3,18 mmol/L NADP und 5,93 mg/mL bzw. 11,68 mmol/L ATP)
- 100 µL Enzymlösung 1 (ca. 4 U/mL Hexokinase und ca. 2 U/mL Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)
- 100 µL Enzymlösung 2 (ca. 9,8 U/mL Phosphoglucose-Isomerase)

Als Standards gab es anzahlig 11 pro Zuckerart eigens hergestellte Ansätze aus DMEM-Medium (DMEM like 31600, Gibco) mit 2%-igem FCS-Gehalt (PAA) sowie folgenden Konzentrationen an D-(+)-Glucose bzw. D-(-)-Fructose (beide: Sigma) in g/L:

1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,09; 0,07; 0,05; 0,03; 0,01; 0,00.

Das etablierte Assay-Protokoll sah dann schrittweise das in folgender **Tabelle 10** dargestellte Vorgehen vor. Informationen zu den Zusammensetzungen der erwähnten Lösungen s. o. bzw. s. **Tab. 7** unter V.1.5.

Tab. 10: Protokoll des Glucose-/Fructose-Assays

1.	10 µL/Well Probe/Standard	D-Glucose bzw. D-Fructose
2.	100 µL/Well Cosubstratlsg	ATP / NADP ⁺
3.	OD-Messung („Baseline“): Spektralphotometer, 340 nm, 3 sec mischen „inside“	
4.	100 µL/Well Enzymlösung 1	HK / G6P-DH
5.	mindestens 5 min warten	
6.	OD-Messung („Glucose“) (wie unter 3.)	NADPH
7.	100 µL/Well Enzymlösung 2	PGI
8.	mindestens 5 min warten	
9.	OD-Messung („Fructose“) (wie unter 3.)	NADPH

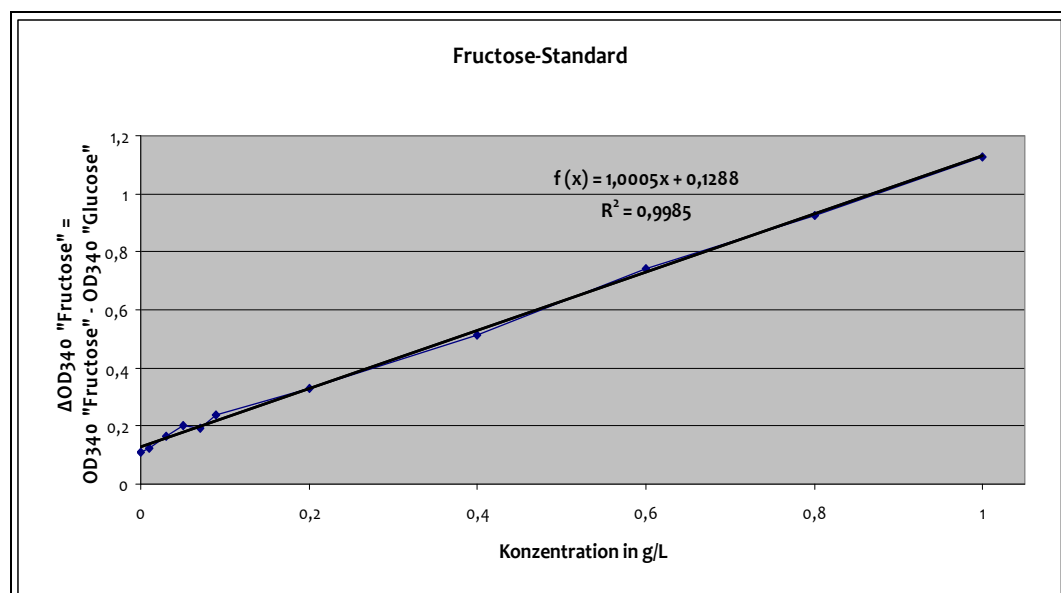
Die o. g. Parameter garantierten den gewünschten Versuchsablauf ohne Saturation mit einer perfekt linearen Konzentrations-Signal-Beziehung bis zu einer OD_{340} von $\sim 2,5$ ($R^2 = 0,99$). Phenolrot, welches in den Medien enthalten war, interferierte dabei nicht mit den Messungen bei 340 nm, da sein Absorptionsmaximum bei ca. 560 nm liegt.

Zunächst wurden die Standards ausgewertet und folgende Rechenschritte vorgenommen:

- (1) OD_{340} „Glucose“ - OD_{340} „Baseline“ = ΔOD_{340} „Gluc“
- (2) OD_{340} „Fructose“ - OD_{340} „Glucose“ = ΔOD_{340} „Fruct“

Anschließend wurden die ermittelten Zahlenwerte unter Verwendung des Programms „MS-Excel 2003“ in zwei Streudiagrammen nach Zuckerart separiert dargestellt. Für das Diagramm der Glucose-Standards wurden also die Werte der ΔOD_{340} „Glucose“, im Fall der Fructose-Standards die Werte der ΔOD_{340} „Fructose“ verwendet, wobei auf der x-Achse die KH-Konzentration des jeweiligen Standards und auf der y-Achse die entsprechenden ΔOD -Werte aufgetragen wurden. I. R. eines Modells der einfachen linearen Regression wurde des weiteren bei beiden Zuckerarten bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ der perfekt lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal in den gemessenen OD_{340} -Bereichen von 0,0 bis 1,2 bei einem Zuckergehalt von 0,0 g/L bis höchstens 1 g/L nachgewiesen. So konnten die Funktionsgleichungen (= Regressionsgleichungen) der den beiden Diagrammen hinzugefügten Trendlinien (= Regressionsgeraden) zur fehlerminimierten quantitativen Berechnung von Glucose bzw. Fructose in den Proben ohne weiteres herangezogen werden. In diesen Regressionsgleichungen der Form $f(x) = ax + b$ war $f(x)$ die ΔOD_{340} „Glucose“ bzw. „Fructose“ und x die Konzentration von Glucose bzw. Fructose in g/L; a und b waren i. R. der Bestimmung der Regressionsgeraden mit Hilfe von Excel geschätzte, invariable Zahlenwerte. Vgl. beispielhaft folgende **Abb. 21**.

Abb. 21: Streudiagramm der ΔOD_{340} -Werte beispielhaft für die Fructose-Standards mit Regressionsgerade, -gleichung und Bestimmtheitsmaß



Zur Bestimmung des Zuckerverbrauchs durch die Knorpelchondrozyten (bzw. ggf. kontaminativ mitbedingt) in den Inkubationsphasen wurde folgendermaßen gerechnet:

$$(3) \quad \text{Ausgangskonzentration}^{*1} [\text{g/L}] - \text{Endkonzentration}^{*2} [\text{g/L}] = \text{Verbrauch} [\text{g/L}]$$

*1 = Konzentration in der passenden Mediumkontrolle, z. B. in „NK M1A B“

(= Nullkontrolle von Mediumtyp M1A, gewonnen beim zweiten Mediumwechsel, d. h. inkubiert während Inkubationsphase B zwischen Mediumwechsel A und B)

*2 = Konzentration im Medienüberstand, z. B. in „1.1 B“ (= Überstand vom Chip in Well 1 der Gruppe 1, inkubiert in Mediumtyp M1A, gewonnen beim zweiten Mediumwechsel, d. h. inkubiert während Inkubationsphase B zwischen Mediumwechsel A und B)

Anschließend wurde von der Einheit g/L in mmol/L umgerechnet:

$$(4) \quad \text{Verbrauch} [\text{g/L}] / (\text{Molare Masse des Zuckers} * [\text{g/mmol}]) = \text{Verbrauch} [\text{mmol/L}]$$

Um von der relativen Angabe des Zuckerverbrauchs als Konzentration zu einer absoluten Aussage in mg zu gelangen, wurde folgende Formel verwendet:

$$(5) \quad (\text{Relativer Verbrauch} [\text{mmol/L}]) \times (\text{Molare Masse des Zuckers} * [\text{mg/mmol}]) \times (\text{Mediumvolumen im Well}^\# [\text{L}]) = (\text{Absoluter Verbrauch des Chips im Well in einer Inkubationsphase} [\text{mg}])$$

$*$ = 0,18016 g/mmol bzw. $0,18016 \times 10^3$ mg/mmol sowohl für Glucose als auch Fructose

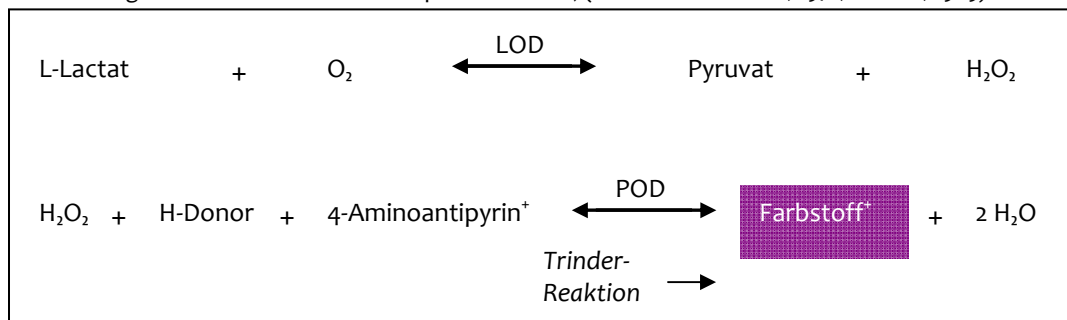
$^\#$ = 0,002 L (12-Well-Platten) bzw. 0,005 L (6-Well-Platten)

V.2.4.2.2 Lactat-Bestimmung

Die Lactat-(Konzentrations-)Bestimmung wurde von PD Dr. T. Stief, Mitarbeiter des Zentrallaboratoriums am Standort Marburg des UKGM (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik), durchgeführt (Studiennummer 166).

Dazu wurde ein Enzym-Assay von Roche verwendet, welches auf der Trinder-Reaktion beruht und L-Lactat in den Messproben nachweist. Dabei wird Lactat von einer Lactatoxidase (LOD) zu Pyruvat oxidiert (Barham and Trinder, 1972; Trinder, 1969). Das dabei generierte Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird von einer Peroxidase (POD) genutzt, um ein farbloses Chromogen, 4-Aminoantipyrin, in Gegenwart eines Wasserstoff-Donors (H-Donor) zu einem violetten Farbstoff zu oxidieren (Trinder-Reaktion) (Barham and Trinder, 1972; Trinder, 1969). Die Farbintensität ist direkt proportional zur L-Lactatkonzentration in der Probe. Vgl. **Abb. 22** s. nächste Seite.

Abb. 22: Chemische Reaktionsgleichungen, auf welchen der angewendete Assay zur quantitativen Bestimmung von L-Lactat in den Mediumproben basiert; (Barham and Trinder, 1972; Trinder, 1969)



I. R. einer Doppelbestimmung wurden also für 5 min bei 23° C in Polystyrol-F-Wells (Nunc) 5 µL Probe bzw. Standard mit 200 µL gepufferter Ascorbatoxidase (≥6 U/mL, 100 µkat/L; Reagenz 1) inkubiert, welche den benötigten H⁺-Donor darstellte. Anschließend wurden 50 µL von Reagenz 2 (gepufferte 0,2 mg/mL bzw. 0,98 mM 4-Aminoantipyrin mit ≥ 3 U/mL bzw. 50 µkat/L mikrobieller LOD und ≥4,8 U/mL bzw. 80 µkat/L Meerrettich-POD) hinzugefügt und nach 5 min bei 23° C die Absorbationszunahme (Δ OD) im Vergleich zur Nullwert-Messung vor Zugabe von Reagenz 2 bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (DPC, Milenia) gemessen. Als Standards wurden Lösungen verwendet, welche 4,22 mM bzw. 1,11 mM L-Lactat (Lyphochek Lactate Level 1 bzw. 2, BioRad) enthielten.

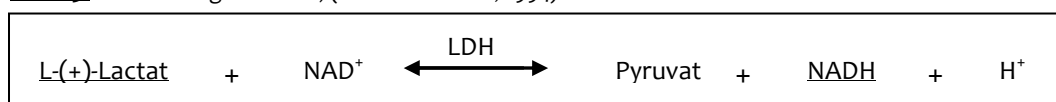
Weiteres zur konkreten Konzentrationsberechnung etc. weiter unten im Anschluss an V.2.4.3.

V.2.4.3 LDH-Bestimmung

Die Messung und Konzentrationsbestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) als Parameter für Zellvitalität bzw. -tod wurde wiederum von PD Dr. T. Stief, Mitarbeiter des Zentrallaboratoriums am Standort Marburg des UKGM (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik), durchgeführt (Studiennummer 166).

Es wurde dazu ein Assay von Roche verwendet, welcher einen von Otto Warburg entwickelten photometrischen Test nutzt, um die LDH-Menge in einer Probe zu bestimmen. Hierbei katalysiert die LDH die Umwandlung von L-Lactat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD zu NADH (Warburg-Reaktion, Reaktionsgleichung s. u. in **Abb. 23**) (Bais and Philcox, 1994). Das generierte NADH wird als Absorptionsänderung (Δ OD) bei 340 nm gemessen und ist direkt proportional zur LDH-Menge in der Probe.

Abb. 23: Die Warburg-Reaktion, (Bais and Philcox, 1994)



Konkret wurden 40 µL Probe bzw. Standard mit 200 µL der Reagenz 1 (80 mM N-Methylglutamin, pH 9,4 bei 37° C; 12,4 mM Lithiumlactat) in Polystyrol-F-Wells (Nunc) bei 23° C inkubiert. Zum Start der Reaktion wurden 50 µL der Reagenz 2 (12,4 mM NAD) hinzugegeben. Nach 120 min wurde die optische Dichte bei 340 nm mittels eines Mikrotiterplatten-

Photometers (Sunrise, Tecan) bestimmt und mit dem Nullwert vor Reaktionsstart verglichen (Δ OD). Als Standards wurden Lösungen verwendet, welche 40,3 U/L bzw. 80 U/L LDH (Lyphocheck Lactate Level 1 bzw. 2, BioRad; je 1:4 mit NaCl 0,9 % verdünnt) enthielten.

Zu V.2.4.2.2 und V.2.4.3:

Ähnlich wie im Fall des Zuckerverbrauchs wurde die Differenz zwischen der Lactat- bzw. LDH-Konzentration in den Knorpel-Medienüberständen und den jeweils entsprechenden Mediumnullkontrollen gebildet und so das tatsächlich durch Knorpelmetabolismus (oder ggf. zusätzlich durch Kontamination) produzierte Lactat bzw. angefallene LDH ermittelt. Die pro Knorpelchip und Inkubationsphase produzierte Lactatmenge wurde anschließend wie die Werte vom Glucose- und Fructoseverbrauch noch von mmol/L in mg umgerechnet, um einen Absolutwert zu erhalten und sie direkt mit dem KH-Verbrauch vergleichen zu können. Denn aus 1 Mol Glucose entstehen zwar 2 Mol Lactat, aber aufgrund der molaren Massen ergibt dies eine identische Gewichtsmenge. Für die Synovialflüssigkeit und die Mediumnullkontrollen wurden die Lactatwerte von mmol/L in die Einheit g/L umgerechnet, ebenfalls zwecks besserer Vergleichbarkeit mit dem Glucosegehalt in Gelenksolution und eingesetzten Nährmedien.

V.2.5 Statistische Methoden

Für deskriptive und analytische Statistik inklusive grafischer Darstellungen wurde die *Open Source Software* des Programms „R“ (Version 2.15.1) verwendet. Verlaufskurven wurden in „MS Excel 2003“ erstellt.

Bei der Auswertung der Daten, die aus Analysen der Medienüberstände gewonnen worden waren (KH-Stoffwechsel, LDH-Anfall und pH-Wert), wurden für Darstellung und statistisches Testen dieser Werte für die Inkubationsphasen A-D jeweils zwei Gruppen zusammengefasst (z. B. 1+2, 3+4 etc.) und als eine behandelt, da sie identischen Versuchsbedingungen unterlagen. Da nach acht Tagen Inkubation die Hälfte der Gruppen ausschieden, standen dann für die Phasen E-H je Experimentalkonstellation nur noch eine Gruppe und damit ein (mindestens) auf die Hälfte reduzierter Stichprobenumfang zur Verfügung. Es wurden auch nur jene Probenwerte einbezogen, welche nicht durch kontaminierende Mikroorganismen mitbedingt waren, sodass die dargestellten Ergebnisse ausschließlich kartilaginäre Stoffwechseleigenschaften umfassen. Damit ging eine z. T. erhebliche Reduzierung des verfügbaren Stichprobenumfangs und somit der statistischen Aussagekraft, v. a. für die letzte Inkubationsphase H, einher (vgl. VI.3 für Details hinsichtlich kontaminierter Wells). Wenn negative Zahlenwerte auftraten, wurde davon ausgegangen, dass es in der jeweiligen Probe zu keinem KH-Verbrauch oder -anfall bzw. keiner LDH-Freisetzung gekommen war und die Werte wurden auf 0,0 gesetzt. In einem Fall stand keine auswertbare Mediumnullkontrolle (NK M1B B) zur Verfügung. Um die interessierenden Parameter für die in Mediumtyp M1B inkubierten Chips während der Phase B dennoch näherungsweise zu bestimmen, wurde mit

den Mittelwerten für Glucose-, Fructose-, Lactat- und LDH-Gehalt gerechnet, die aus den asservierten sieben anderen NK-M1B-Proben gebildet wurden.

Angesichts der kleinen Stichprobenumfänge von pro Gruppe meist < 10 (je nach Fragestellung) und zu erwartender Testverzerrungen aufgrund uneinheitlicher Stichprobencharakteristika (z. B. Verteilung des Nassgewichts in den unterschiedlichen Gruppen) entschied man sich bei Versuchsplanung als statistischen Test für alle Fragestellungen den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-(H-)Test mit einem Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test als *Post-hoc*-Analyse anzuwenden, da parameterfreie Tests gerade bei sehr geringen Stichprobenumfängen eine größere Güte aufweisen als ihre parametrischen Gegenstücke (Rudolf and Kuhlisch, p. 164, 2008). Es ist hinzuzufügen, dass dennoch parametrische Verfahren (ANOVA mit Tukey-Test *post hoc*) und mit dem Steel-Test auch ein im Vergleich zum Bonferroni-adjustiertem U-Test ein weniger konservativer parameterfreier *Post-hoc*-Test im Anschluss an den H-Test durchgeführt wurden, ohne dass sie andere signifikante Unterschiede lieferten. Korrelationsanalysen wurden nach der Pearson-Methode realisiert.

VI Ergebnisse

Die schon in Abschnitt V dieser Arbeit abgebildete **Tab. 8** dient noch einmal der Übersicht über die (Unterscheidungs-)Merkmale der 16 Versuchsgruppen, deren Ergebnisse nun im Folgenden dargestellt werden.

Tab. 8: Aufstellung der verschiedenen Versuchsgruppen und ihrer jeweiligen Experimentalbedingungen

6-Well-Format, 5 mL Medium/Well		12-Well-Format, 2 mL Medium/Well	
8 d Kultivierung	16 d Kultivierung	8 d Kultivierung	16 d Kultivierung
Medium 1A (M1A) mit 1 g/L Fructose			
Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Medium 1B (M1B) mit 1 g/L Fructose und 2% (V/V) FCS			
Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	Gruppe 8
Medium 2A (M2A) mit 1 g/L Glucose			
Gruppe 9	Gruppe 10	Gruppe 11	Gruppe 12
Medium 2B (M2B) mit 1 g/L Glucose und 2% (V/V) FCS			
Gruppe 13	Gruppe 14	Gruppe 15	Gruppe 16
Pro Gruppe 6 Elemente			

VI.1 Knorpelvitalität - die Experimentalgruppen im Vergleich

VI.1.1 Histologische und immunhistochemische Beurteilung

Die mikroskopische Beurteilung der Knorpelchips bei den während des laufenden Versuchs durchgeführten Kontrollen der Kulturplatten zeigte glattrandig begrenzte Bioplate ohne fransenartige Ausläufer mit vereinzelt auswachsenden Fibroblasten-artigen Zellen.

Bei orientierendem Betrachten der HE-gefärbten Gewebeschnitte trat die für Gelenkknorpel typische Morphologie mit erhaltener Ultra-Struktur hinsichtlich Zellverteilung und -aspekt in Abhängigkeit von der jeweiligen Knorpelzone (vgl. III.2.2) zu Tage.

VI.1.1.1 Histomorphologischer Score

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse ergaben sich aus der Beurteilung der Chondrozytenmorphologie anhand HE-gefärbter Gewebeschnitte.

Da die mikroskopischen Ausschnitte nicht korrespondierende Knorpelchipbereiche, sondern zufällig ausgewählte Areale und so verschiedene Knorpelzonen umfassten, variierte die erfasste Zellzahl z. T. erheblich (Mittelwert 200 (38-291) Zellen \pm 43).

In der Gruppe der nicht kultivierten Kontrollen waren durchschnittlich $90,8 \pm 5,3$ % der Zellen vital, während dies in den Versuchsgruppen global bei $66,4 \pm 18,9$ % der Fall war (Vitalität Kontrollen > Vitalität Versuchsgruppen gesamt; U-Test: $\sim \Delta$: 20,5 %; p-Wert < 0,05). Die Mediane lagen bei 92,5 bzw. 70,5 %. Die Mittelwerte innerhalb der Gruppen 1-16 variierten zwischen 44 und 82,8 %, ihre Mediane zwischen 47 und 84 %. Vgl. **Tab. 11** s. nächste Seite.

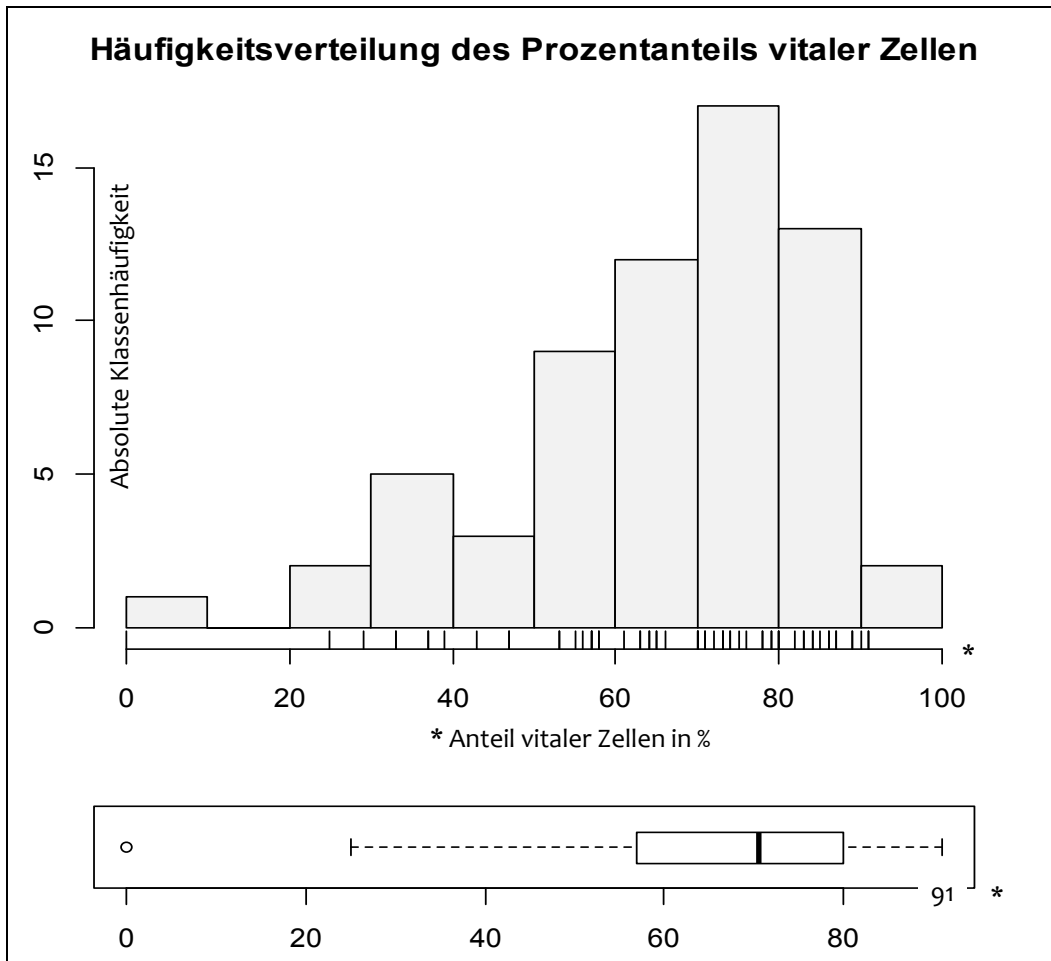
Die nicht-vitalen Zellen umfassten zum allergrößten Teil apoptotische Zellen und kaum nekrotische.

Tab. 11: Statistische Kennwerte der Knorpelvitalität in den Versuchsgruppen, ermittelt anhand der HE-gefärbten Gewebeschnitte als prozentualer Anteil histomorphologisch vitaler Zellen

Gruppe	Anteil vitaler Zellen in Prozent (Variationskoeffizient einheitslos)				
	MW	SD	Var.-koeff.	Median	Var.-breite
Kontrollen	90,8	5,3	0,1	92,5	12
1 - 16	66,4	18,9	0,3	70,5	91
1	74,8	16,5	0,2	78,5	36
2	65,3	13,0	0,2	69,0	29
3	49,0	14,1	0,3	47,5	27
4	53,3	23,4	0,4	52,0	51
5	64,3	14,2	0,2	70,5	30
6	48,3	23,1	0,5	47,0	49
7	69,0	14,7	0,2	66,0	30
8	62,0	7,2	0,1	61,5	15
9	82,0	5,4	0,1	84,0	12
10	76,5	11,3	0,1	75,5	27
11	77,3	16,7	0,2	82,5	38
12	44,0	35,2	0,8	48,0	80
13	79,5	11,8	0,1	83,0	26
14	71,3	11,1	0,2	71,0	27
15	82,8	5,3	0,1	81,5	12
16	63,0	14,3	0,2	63,0	32

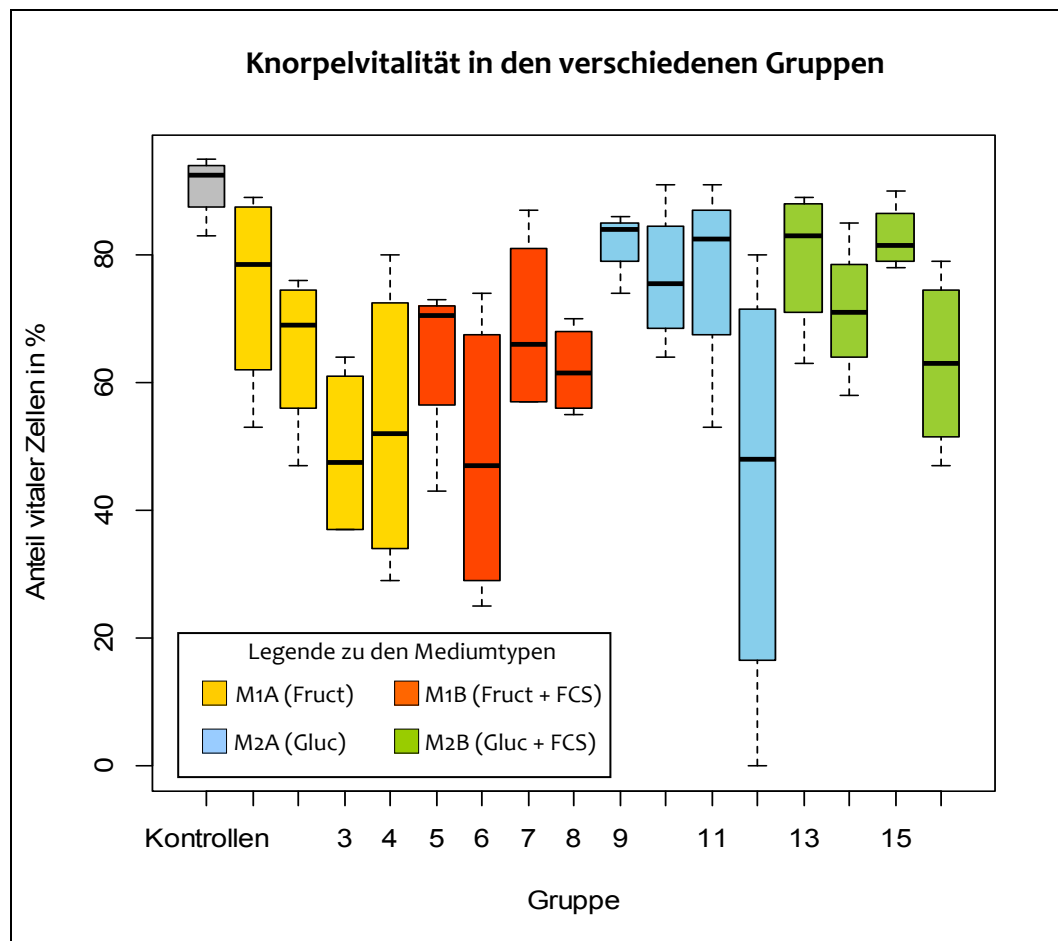
Bei Betrachtung von **Abbildung 24** (s. nächste Seite) zur Datenverteilung des Anteils histomorphologisch vitaler Zellen in allen Versuchsgruppen in Form klassifizierter Häufigkeiten fällt eine rechtssteile Dispersion auf mit einem *Peak* von absolut 17 untersuchten Proben bzw. anteilig 27 % in der Prozent-Klasse „(70,80]“. **Tabelle 12** mit den Werten für alle Klassen findet sich im Anhang.

Abb. 24: Histogramm und Boxplot zur Häufigkeitsverteilung des Merkmals Knorpelvitalität in den Versuchsgruppen insgesamt anhand des prozentualen Anteils histomorphologisch vitaler Chondrozyten in HE-gefärbten Gewebeschnitten



Die Multi-Boxplot-Grafik in **Abbildung 25** (s. nächste Seite) zeigt den prozentualen Anteil histomorphologisch vitaler Zellen für die Gruppen 1-16 sowie der Kontrollen einzeln. Dort ist zu erkennen, dass die nicht kultivierte Kontrollgruppe eine höhere Vitalität aufweist als sämtliche kultivierten Gruppen. Vergleicht man - weiterhin lediglich deskriptiv - zwischen Gruppen, die sich nur hinsichtlich des im Nährmedium angebotenen Kohlenhydrats unterschieden (z. B. 1 vs. 9, 2 vs. 10 oder 8 vs. 16 etc.), war das Überleben der mit Glucose versorgten Chips (Gruppen 9-16, M2A und M2B) größer als die Vitalität der mit Fructose und ansonsten unter identischen Bedingungen kultivierten Knorpel, ohne dass dies statistisch signifikant war (s. u.). Ebenfalls ist erkennbar, dass die Vitalität in den 16-tägig geführten Gruppen (mit geraden Zahlen nummeriert) mit Ausnahme der Konstellation „4 vs. 3“ im Vergleich zur Vitalität in ihren 8-tägigen Pendanten geringer (ungerade nummeriert) ausfiel. Für die Gegenüberstellung der Knorpelvitalität für „FCS vs. kein FCS“ im Nährmedium (z. B. 1 vs. 5 oder 9 vs. 13 etc.) lässt sich anhand der Boxplots keine Tendenz erkennen. Ein höheres Mediumangebot von 5 mL anstelle von 2 mL pro Well wiederum verbesserte das Überleben laut Grafik (z. B. Vergleiche 1 vs. 3 oder 14 vs. 16 etc.).

Abb. 25: Multi-Boxplot-Grafik zur Knorpelvitalität in den Versuchs- und der Kontrollgruppe anhand des prozentualen Anteils histomorphologisch vitaler Chondrozyten in HE-gefärbten Gewebeschnitten



Bei statistischen Tests auf Unterschiede in der Vitalität zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen kam es in keinem Fall zu einem signifikanten Ergebnis. Dies gilt sowohl für parametrische als auch nicht-parametrische Tests ebenso wie für konservative und weniger konservative *Post-hoc*-Verfahren.

Da bei den gegebenen Voraussetzungen hinsichtlich Stichprobengröße etc. mit Blick auf größtmöglich zu erreichende Power am sinnvollsten ein nicht-parametrischer Test war, sind in **Tabelle 13** (s. nächste Seite) also die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede in der histomorphologischen Knorpelvitalität und seiner *Post-hoc*-Analyse - dem zweiseitigen, Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test - dargestellt. I. R. des U-Tests wurden nur jene Paare verglichen, die sich in ausschließlich einer Versuchsbedingung unterschieden. Die Ausprägungsvariante dieses Einflussfaktors ist in der Tabelle in der Spalte „Paarvergleich“ unter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt.

Nullhypothesen H_0 :

H-Test: Es gibt keine Lageunterschiede zwischen den Verteilungen der Vitalität aller Gruppen.

U-Test: Es gibt keinen Lageunterschied zwischen den Verteilungen der Vitalität der zwei verglichenen Experimentalgruppen.

Alternativhypothesen:

H-Test: H_A : Es gibt Lageunterschiede zwischen den Verteilungen der Vitalität für mindestens ein Gruppenpaar (nicht lokalisiert).

U-Test: H_A : Es gibt einen Lageunterschied zwischen den Verteilungen der Vitalität der zwei verglichenen Experimentalgruppen.

Signifikanzniveaus:

H-Test: $\alpha = 0,05$

U-Test: Das multiple Signifikanzniveau α' wurde für 32 Paarvergleiche nach der Bonferroni-Korrektur adjustiert:

$$\alpha' = 0,05/32 = 1,56E-03.$$

Konfidenzintervalle sind nicht mit aufgeführt, da sämtliche Paarvergleiche ohnehin kein mit Signifikanz vereinbares Intervall sowie keinen p-Wert $\leq 1,56E-03$ lieferten.

Tab. 13: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede in der histomorphologischen Knorpelvitalität und seiner Post-hoc-Analyse (zweiseitiger, Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test für Paare, die sich in einer Versuchsbedingung unterschieden)

Legende:	χ^2	=	Teststatistik des H-Tests (für Stichprobenumfänge $n > 5$ näherungsweise Chi-Quadrat-verteilt (Rudolf and Kuhlisch, p. 336, 2008))
	f	=	Freiheitsgrade
	U	=	Teststatistik des U-Tests
	$\sim\Delta$	=	geschätzter Lageunterschied zwischen den Verteilungen der Knorpelvitalität der beiden verglichenen Gruppen
	\rightarrow	=	Testentscheidung
	5 mL	=	5 mL Medium pro Well
	2 mL	=	2 mL Medium pro Well
	8 d	=	8 Tage kultiviert
	16 d	=	16 Tage kultiviert

Paarvergleich		H-Test Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=15$ und $\alpha=0,05$: 25,00		U-Test Kritische Werte: $U_{n=4, n=4, \alpha=0,05} = 1$			
vs.		χ^2	p-Wert	U	$\sim\Delta$ [%]	p-Wert	\rightarrow
1	9	26,26	0,03534 *	7,5	-1,5	0,9714	H_0
Fruct	Gluc						
2	10			4,5	-10,5	0,4	H_0
Fruct	Gluc						
3	11			2	-26	0,1143	H_0
Fruct	Gluc						
4	12			9,5	4	0,7714	H_0
Fruct	Gluc						
5	13		\rightarrow H_A	3	-16	0,2	H_0
Fruct	Gluc						
6	14			4	-24,5	0,3429	H_0
Fruct	Gluc						
7	15			3	-18	0,1714	H_0
Fruct	Gluc						

Tab. 13 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (histomorphologische Knorpelvitalität)

Paarvergleich		H-Test Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für f=15 und $\alpha=0,05$: 25,00		U-Test Kritische Werte: $U_{n=4,n=4,\alpha=0,05}$: 1			
vs.		χ^2	p-Wert	U	$\sim\Delta$ [%]	p-Wert	→
8	16			7,5	-0,5	0,9429	H ₀
Fruct	Gluc						
1	5			11,5	14	0,4	H ₀
Ø FCS	FCS						
2	6			12	14,5	0,3429	H ₀
Ø FCS	FCS						
3	7			4	-21,5	0,2857	H ₀
Ø FCS	FCS						
4	8			6	-10,5	0,6857	H ₀
Ø FCS	FCS						
9	13			7	-2	0,8571	H ₀
Ø FCS	FCS						
10	14			11	6	0,4857	H ₀
Ø FCS	FCS						
11	15			8,5	0,5	0,9714	H ₀
Ø FCS	FCS						
12	16			6	-15	0,6857	H ₀
Ø FCS	FCS						
1	3			14	26,5	0,1143	H ₀
5 mL	2 mL						
2	4			10,5	9,5	0,5714	H ₀
5 mL	2 mL						
5	7			6	-4,5	0,6286	H ₀
5 mL	2 mL						
6	8			6	-15,5	0,6857	H ₀
5 mL	2 mL						
9	11			10	1,5	0,6286	H ₀
5 mL	2 mL						
10	12			13	29,5	0,2	H ₀
5 mL	2 mL						
13	15			7	-1	0,8857	H ₀
5 mL	2 mL						
14	16			11,5	8,5	0,4	H ₀
5 mL	2 mL						
1	2			11	11,5	0,4857	H ₀
8 d	16 d						
3	4			6	-4,5	0,6286	H ₀
8 d	16 d						
5	6			11	11	0,4857	H ₀
8 d	16 d						
7	8			11	3,5	0,5143	H ₀
8 d	16 d						
9	10			11	7	0,4571	H ₀
8 d	16 d						
11	12			14	24	0,1143	H ₀
8 d	16 d						
13	14			12	8	0,3429	H ₀
8 d	16 d						
15	16			15	21	0,0571	H ₀
8 d	16 d						

Die vorstehende Tabelle zeigt zwar einen signifikanten H-Test, was für einen signifikanten Unterschied in mindestens einem Paarvergleich spricht. Jedoch war davon kein interessierender Vergleich betroffen.

VI.1.1.2 M30 CytoDEATH®

Die aus der M30-CytoDEATH®-Methode generierten Ergebnisse werden wie im Fall des morphologischen Scores hinsichtlich des Merkmals der (immunhistochemischen) Zellvitalität (= M30-CytoDEATH®-Negativität bzw. Nicht-(Früh-)Apoptose) dargestellt.

Beim Mikroskopieren war auffällig, dass M30-CytoDEATH®-positive Zellen zumeist in Clustern angeordnet waren und z. T. noch einen morphologisch intakten Aspekt aufwiesen. Außerdem waren manche Zellen, obwohl geschwollen, also histomorphologisch nekrotisch, oder mit geschrumpftem Zellkern und *apoptotic bodies* ausgestattet, also histomorphologisch spät-apoptotisch, M30-negativ gelabelt.

Das gruppierte Säulendiagramm in **Abbildung 26** (s. nächste Seite) stellt den Durchschnitt der histomorphologischen (HE-Färbung) Zellvitalität in Kontrollen und Versuchsgruppen demjenigen der immunhistochemischen (M30-CytoDEATH®) gegenüber. Die Vitalität in der Kontrollgruppe fiel unter letzterer Methode mit ca. 79 % deutlich geringer aus als in der Histomorphologie. Auch im Vergleich mit den kultivierten Gruppen nahm sie nur einen mittleren Platz ein, während die Kontrollgruppenvitalität nach histomorphologischen Kriterien mit ca. 91 % die Vitalität der Versuchsgruppen in jedem Fall deutlich überstieg. Dagegen war die Vitalität ansonsten in der immunhistochemischen Beurteilung eher größer als in der Histomorphologie. Besonders auffällig ist dies im Fall der Gruppen 5-8, die in Mediumtyp M1B (Fructose + FCS) kultiviert wurden.

Abb. 26: Gruppiertes Säulendiagramm zur Gegenüberstellung des prozentualen Anteils histomorphologisch (HE-Färbung) vs. immunhistochemisch (M30 CYTODEATH®) vitaler Zellen in den 16 Versuchs- und der Kontrollgruppe (K)

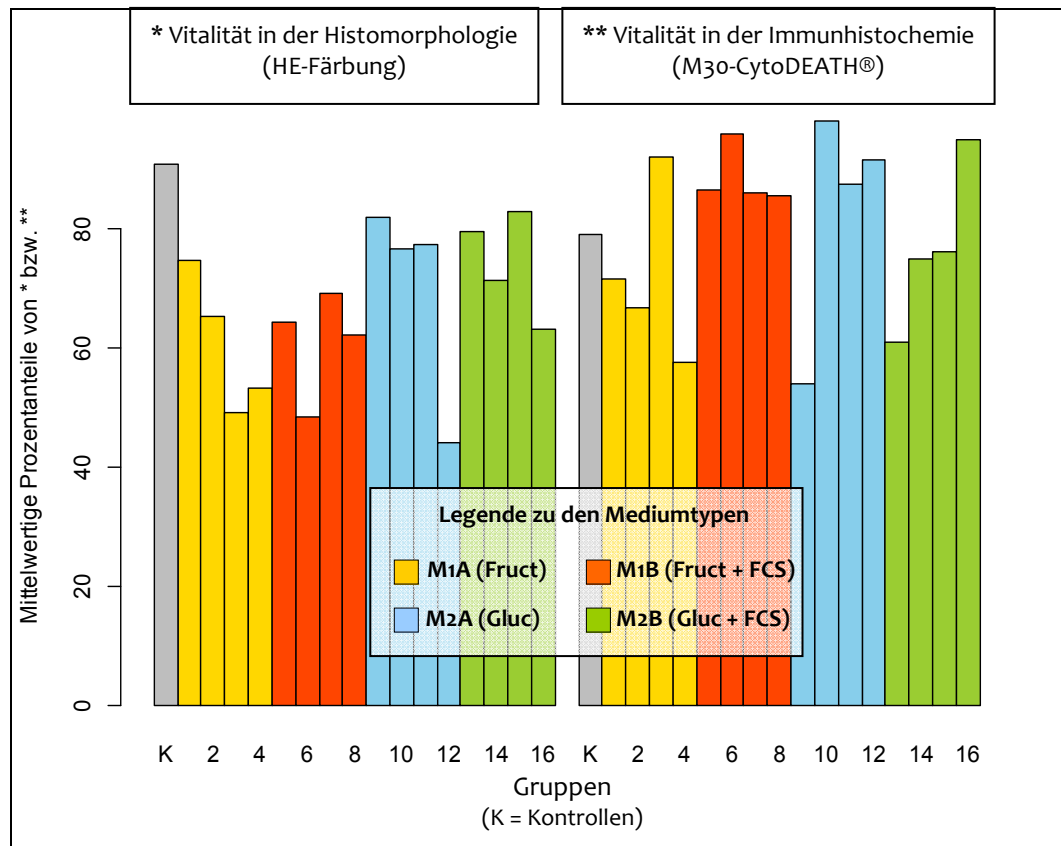


Tabelle 14 mit den Zahlenwerten (MW und Median) zu **Abbildung 26** findet sich im Anhang. Statistische Tests wurden ob der geringen M30-CytoDEATH®-behandelten Probenanzahl nicht durchgeführt.

VI.1.1.3 TUNEL-Methode

Die TUNEL-behandelten Proben eigneten sich nicht für Auswertungszwecke, da sich trotz korrekt durchgeführter Methodik mit ausnahmslos TUNEL-negativen Negativkontrollen (blaue Zellkerne) sowie TUNEL-positiven Positivkontrollen (braune Kerne) herausstellte, dass alle Zellen sämtlicher übriger Gewebeschnitte - sowohl der nicht kultivierten Nullkontrollen als auch der 8- bzw. 16-tägig geführten Versuchsgruppen - TUNEL-Positivität zeigten. Da in vielen Fällen jedoch kein histomorphologischer Anhalt für Apoptose zu finden war und es auch aus dem Blickwinkel der Wahrscheinlichkeit nahezu unmöglich erschien, dass alle Zellen aller Gruppen apoptotisch waren, wertete man dieses Ergebnis in Absprache mit dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg (Frau Dr. med. M. Roeßler) als Versagen der TUNEL-Methode mit falsch-positiven Resultaten. Vgl. VII.1.1.

VI.1.2 LDH-Release als Surrogatparameter im Verlauf

Das ins Medium freigesetzte LDH korrelierte als bekannter Zelltodmarker negativ mit der i. R. des histomorphologischen Scores an HE-gefärbten Gewebeschnitten festgestellten Knorpelzellvitalität (Pearson's Korrelationskoeffizient: -0,35; p-Wert < 0,05) und wird im Folgenden sowohl im Verlauf dargestellt als auch als für alle Inkubationsphasen A-H bzw. A-D (Gruppen ungerader Nummern) aufsummierter Kumulativwert.

Die Synovialflüssigkeit des bioptierten Gelenks enthielt 411,1 U/L LDH. In den Nullkontrollen der Medientypen M1A und M2A waren im Mittel 2,3 U/L LDH nachweisbar, in den FCS-haltigen Varianten M1B und M2B befanden sich durchschnittlich 9,4 U/L.

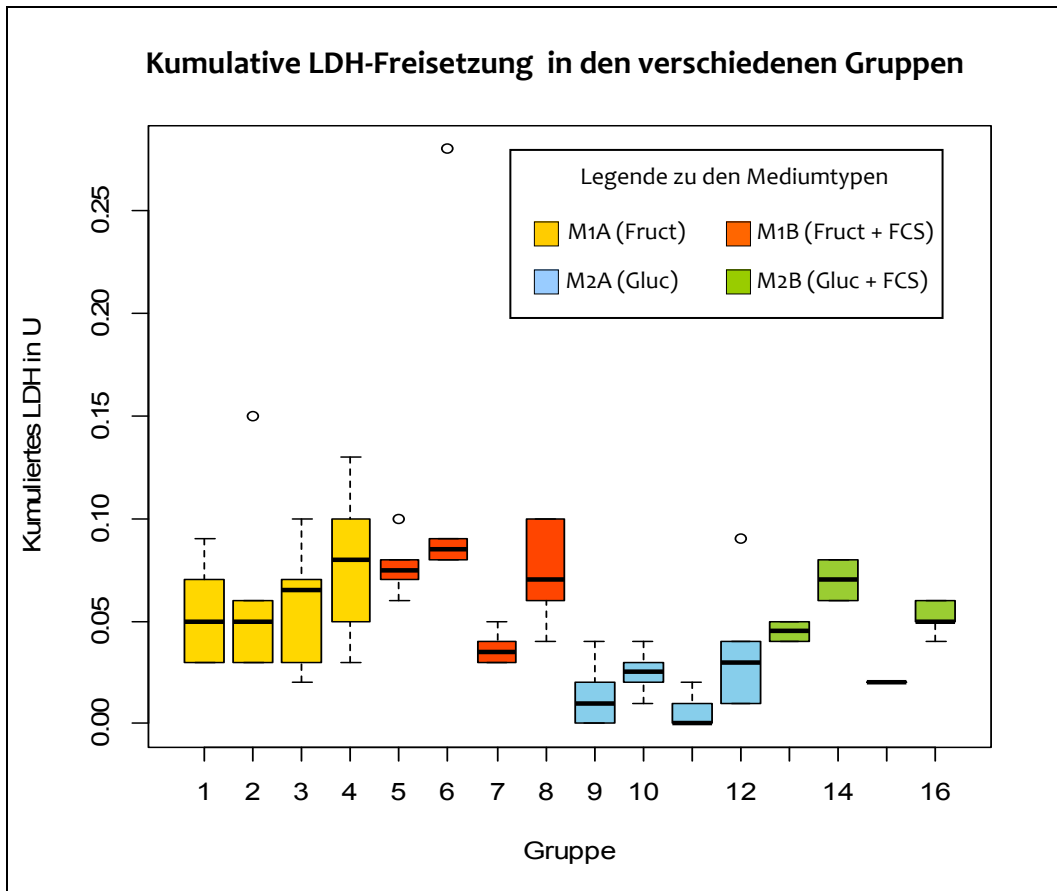
Die Häufigkeitsverteilung des kumuliert freigesetzten LDH pro Chip aller Gruppen zeigt eine deutliche Linksteilheit mit einem dem Median entsprechenden Mittelwert von 0,05 U (vgl. folgende **Tab. 15**).

Tab. 15: Klassifizierte Häufigkeiten des während des gesamten Versuchs kumulativ freigesetzten LDH für die Versuchsgruppen gemeinsam

Häufigkeit	Klasse „Kumulierte LDH-Freisetzung“ [U]					
	[0; 0,05]	(0,05; 0,1]	(0,1; 0,15]	(0,15; 0,2]	(0,2; 0,25]	(0,25; 0,3]
Absolut	56	37	2	0	0	1
Relativ	0,58	0,39	0,02	0,00	0,00	0,01

Die Multi-Boxplot-Grafik in **Abbildung 27** (s. nächste Seite) spricht für einen höheren kumulativen LDH-Release in den Fructosegruppen (1-8, M1A und M1B), wenn man diese mit ihrem jeweiligen Glucose-Gegenstück vergleicht (z. B. 1 vs. 9 etc.). Gleiches gilt für sämtliche 16-tägig geführten Gruppen (gerade nummeriert) im Vergleich zu den nur 8-tägig, aber ansonsten unter identischen Bedingungen inkubierten Knorpelproben (z. B. 1 vs. 2 etc.) ebenso wie für den Vergleich zwischen mit und ohne FCS im Medium (z. B. 1 vs. 5 etc.). Diese und weitere Unterschiede zwischen Gruppen konnten jedoch nicht als statistisch signifikant eingestuft werden (Mann-Whitney-U-Test nach Kruskal-Wallis-(H-)Test: p-Wert > α' für alle Vergleiche der 32 sich in einer Versuchsbedingung unterscheidenden Paare, wobei $\alpha' = 0,05/32 = 1,56E-03$ nach Bonferroni-Korrektur). Für den Vergleich zwischen 5 mL und 2 mL Medium pro Well (z. B. 1 vs. 3 etc.) ist anhand der Boxplots keine Tendenz erkennbar.

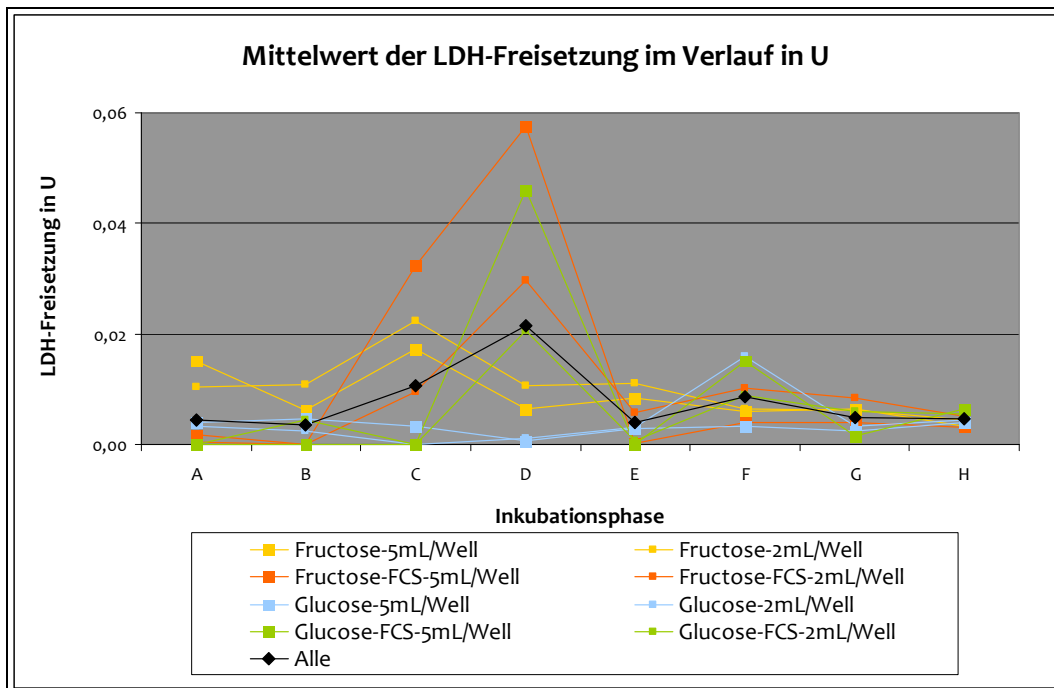
Abb. 27: Multi-Boxplot-Grafik zur kumulativen LDH-Freisetzung in den Versuchsgruppen anhand der während des gesamten Versuchszeitraumes in einer Gruppe freigesetzten LDH-Menge pro Chip



Bei Betrachtung der LDH-Freisetzung pro Chip im Verlauf (**Abb. 28**, s. nächste Seite) fällt auf, dass es global (schwarze Kurve) nach 8 Tagen Versuchsdauer (D) zu einem *Peak* und nach 12 Tagen (F) zu einem weiteren kleineren Ausschlag kam. Sehr ausgeprägt sind diese *Peaks* vor allem bei den Verlaufskurven der Gruppen, die in den Medien mit FCS kultiviert wurden.

Außerdem ist wie in der Multi-Boxplot-Grafik erkennbar, dass LDH eher vermehrt in den Fructose- als in den entsprechenden Glucosegruppen liberiert wurde. Die Werte für die Inkubationsphasen G und H liegen dagegen für alle Gruppen eng beieinander und vermitteln den Eindruck eines zum Versuchsende hin absteigenden Verlaufs der LDH-Freisetzung. Die in 5 mL Medium pro Well mit Medientyp M2A (Glucose ohne FCS) inkubierten Knorpel (Gruppen 9+10 bzw. nach Phase D nur noch Gruppe 10) weisen den gleichmäßigsten und insgesamt auf niedrigstem Niveau stattfindenden Verlauf des LDH-Release auf (blaue Kurve mit großem Quadrat zur Datenmarkierung), während in Gruppe 5+6 (5 mL Medium pro Well mit Medientyp M1A (Fructose ohne FCS)) die durchschnittliche Freisetzung in Phase D mit ca. 0,06 U am größten ist (orange Kurve mit großem Quadrat).

Abb. 28: Verlaufskurven der LDH-Freisetzung pro Chip, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A-H, wobei je eine Kurve die Werte aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen, unter identischen Experimentalbedingungen akquirierten Mediumproben mittelwertig darstellt (exkl. die schwarze Kurve, welche alle Gruppen zusammenfasst)



Tabellen 16 und **17** mit den entsprechenden Zahlenwerten zu obigen **Abbildungen 27** und **28** sowie weiteren statistischen Kennwerten finden sich im Anhang.

VI.2 Knorpelmetabolismus - die Experimentalgruppen im Vergleich

VI.2.1 Aktivität des Kohlenhydratstoffwechsels im Verlauf

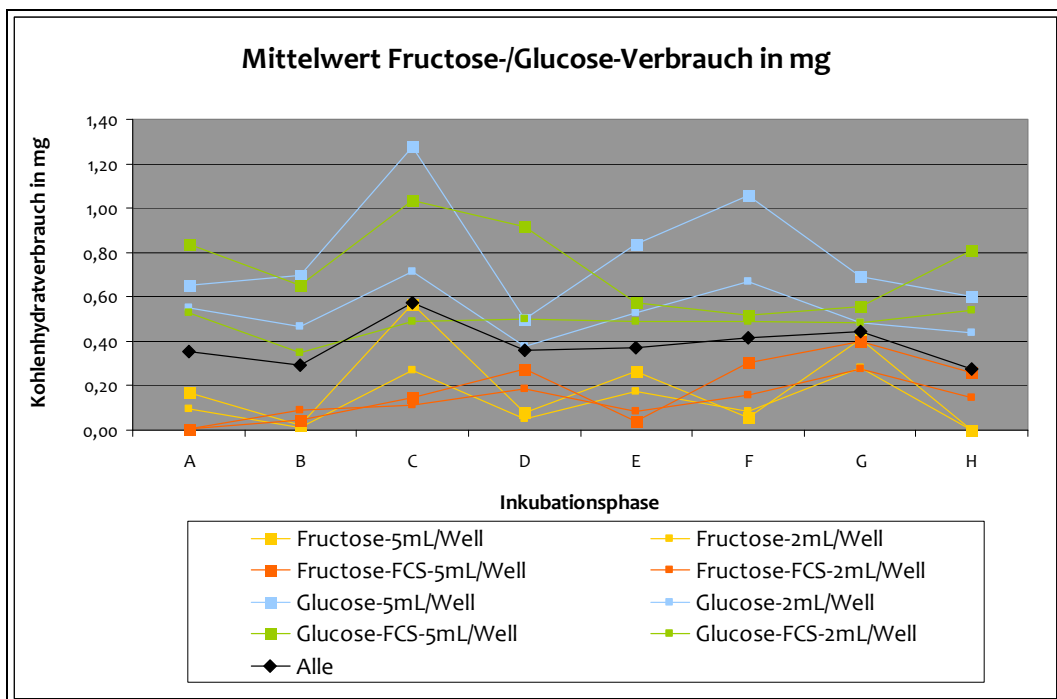
VI.2.1.1 Fructose- bzw. Glucoseverbrauch

Die Synovialflüssigkeit des biotierten Gelenks enthielt 1,34 mmol/L bzw. 0,24 g/L Glucose, keine Fructose und damit nur ca. ein Viertel dessen, was an Zucker in den Versuchsmedien enthalten war (5,55 mmol/L bzw. 1 g/L Fructose oder Glucose). Dieses Kohlenhydratangebot in den Nährmedien wurde von den Knorpelchips maximal zu 26 % ausgeschöpft, in den allermeisten Fällen lag der Verbrauch deutlich darunter.

Der KH-Verbrauch aller Gruppen anhand der statistischen Kennwerte der deskriptiven Statistik (s. **Tab. 18** im Anhang) und der Verlaufskurven in **Abbildung 29** (s. nächste Seite) global betrachtet (schwarze Kurve), bewegte sich während der einzelnen Inkubationsintervalle zwischen durchschnittlich 0,28 und 0,58 mg KH pro Chip mit erheblichen Unterschieden zwischen den Gruppen unterschiedlicher Experimentalbedingungen: Dabei ist die Differenz zwischen den Gruppen 1-8 (Fructosemedium) und 9-16 (Glucosemedium) besonders deutlich, der Glucoseverbrauch generell erheblich größer als die Verstoffwechselung von Fructose. So wurde auch der Maximalwert mit durchschnittlich ca. 1,3 mg pro Chip für die Gruppen 9+10 in Phase C gemessen (5 mL/Well Glucosemedium M2A ohne FCS, blaue Kurve mit großen Quadraten). Darüber hinaus war der KH-Metabolismus in den

Gruppen mit einem größeren Nährmediumangebot von 5 mL pro Well anstelle von 2 mL in sämtlichen sinnvoll zu vergleichenden Experimentalkonstellationen (jeweils Kurve mit großem vs. Kurve der gleichen Farbe mit kleinem Quadrat) und jeder Phase aktiver (ausgenommen Phase B und E für M1B sowie Phase F für M1A). Dagegen ist für den Vergleich der FCS-geführten Gruppen mit denjenigen ohne FCS im Nährmedium und ansonsten gleichen Bedingungen (gelbe vs. orange und blaue vs. grüne Kurven gleichen Aspekts) keine eindeutige Aussage zu treffen. Die Verlaufsgrafik zeigt einige, von Kurve zu Kurve unterschiedliche Peaks, wobei global betrachtet (schwarze Kurve) der KH-Verbrauch durchaus als gleichmäßig zu bezeichnen ist.

Abb. 29: Verlaufskurven des Kohlenhydratverbrauchs pro Chip, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A-H, wobei je eine Kurve die Werte aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen, unter identischen Experimentalbedingungen akquirierten Mediumproben mittelwertig darstellt (exkl. die schwarze Kurve, welche alle Gruppen zusammenfasst)



Die Ergebnisse der analytischen Statistik auf signifikante Unterschiede im KH-Verbrauch zwischen den Gruppen mittels H- und U-Test bestätigen die beschriebenen deskriptiven Beobachtungen und sind detailliert im Anhang in **Tabelle 19** zu finden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Inkubationsphasen A-F für alle Paarvergleiche, die sich nur im Kohlenhydratangebot im Nährmedium unterschieden, dahingehend, dass die mit Glucose versorgten Bioplate einen zwischen 0,2 und 0,98 mg höheren Zuckerverbrauch hatten als jene unter Fructoseeinfluss. Für die beiden letzten Phasen G und H wurde dieser Unterschied nur für den Paarvergleich zwischen Gruppe 8 und 16 in G gefunden. In den übrigen Fällen dieses Zeitraums konnte die Nullhypothese H_0 nicht abgelehnt werden.

Für den Vergleich zwischen dem KH-Verbrauch von Gruppen, deren Experimentalbedingungen sich ausschließlich in der Zugabe von FCS zum Medium oder nicht

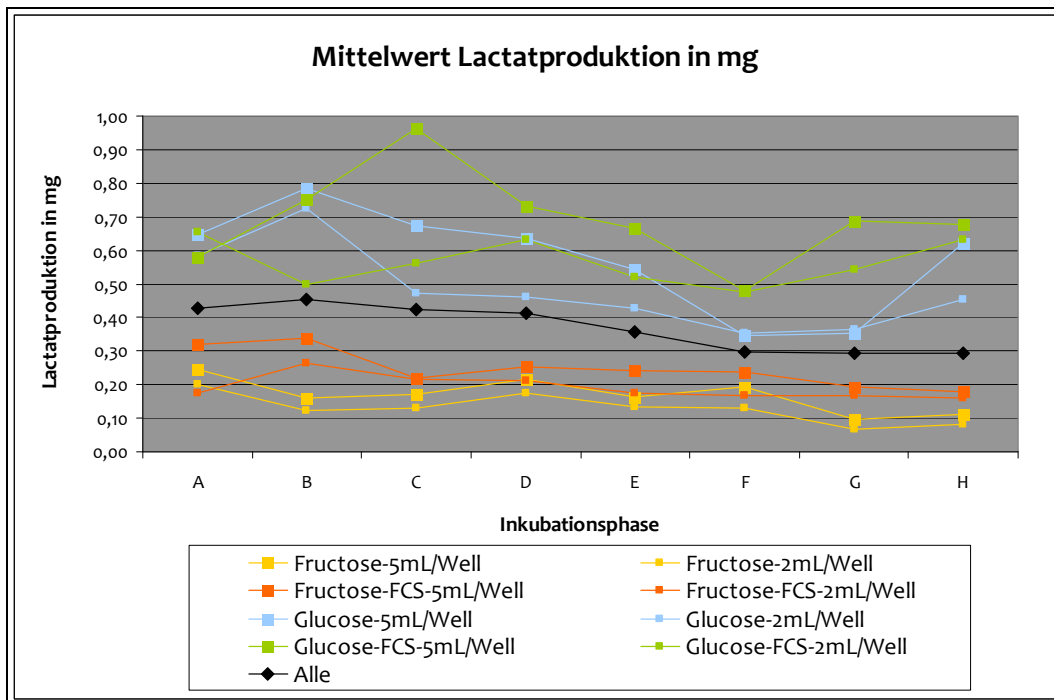
unterschieden, wurden ebenfalls signifikante Ergebnisse gefunden, jedoch ohne eine eindeutige Tendenz einer Überlegenheit der einen gegenüber der anderen Konstellation aufzuzeigen. So ist beispielsweise der Fructoseverbrauch in der FCS-geführten Gruppe bei den Paarvergleichen für Phasen A und C zwischen Gruppen 1+2 und 5+6 sowie 3+4 und 7+8 geringer als in ihrem Nicht-FCS-Gegenstück. Dagegen zeigt sich in z. B. Phase D für alle vier sinnvollen FCS-Vergleiche ein größerer Fructose- bzw. Glucoseverbrauch unter FCS-Einfluss. Betrachtet man die Paarvergleiche für den singulären Unterschied in den Versuchsbedingungen „5 mL vs. 2 mL Medium pro Well“, findet man in knapp der Hälfte der Paarvergleiche in den Phasen A, B, C, D und F eine Überlegenheit für das Mehrangebot an Nährmedium ($\sim \Delta$: 0,15-0,58 mg). Für die übrigen drei Inkubationsphasen kann die Nullhypothese für diese Vergleiche in keinem Fall abgelehnt werden.

VI.2.1.2 Lactatproduktion

Die Synovialflüssigkeit des bioptierten Gelenks enthielt 24,3 mmol/L bzw. 2,19 g/L Lactat und damit knapp das Zehnfache der Glucosekonzentration (0,24 g/L). In den Nullkontrollen der Medientypen M1A und M2A war kein Lactat nachweisbar, in den FCS-haltigen Varianten M1B und M2B befanden sich minimale Mengen zwischen 0,1 und 0,3 mmol/L (entsprechend 0,01-0,03 g/L), je nach angesetzter Charge.

Die Verlaufskurven in **Abbildung 30** (s. nächste Seite) für die Lactatproduktion pro Chip zeigen für die in Fructosemedien geführten Gruppen (gelbe und orange Kurven) einen sehr gleichmäßigen Verlauf auf niedrigem Niveau, was sich auch in einer hohen pH-Wert-Stabilität niederschlägt (vgl. VI.2.1.3). In den Glucosemedien war die Produktion ungleichmäßiger im Versuchsverlauf und außerdem ebenso wie der unter VI.2.1.1 beschriebene KH-Verbrauch wesentlich höher, wobei hier die FCS-Gruppen die Gruppen ohne FCS im Glucosemedium übertrafen (vgl. je blaue vs. grüne Kurven gleichen Aspekts). Der Maximalwert wurde mit mittelwertig 0,96 mg produziertem Lactat für die Gruppen 13+14 in Phase C (Mediumtyp M2B mit Glucose und FCS) ermittelt. Auch in einer Korrelationsanalyse zeigte sich der positive Zusammenhang zwischen KH-Verbrauch und Lactatproduktion in den Versuchsgruppen (Pearson's Korrelationskoeffizient: 0,64).

Abb. 30: Verlaufskurven der Lactatproduktion pro Chip, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A-H, wobei je eine Kurve die Werte aus allen zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen, unter identischen Experimentalbedingungen akquirierten Mediumproben mittelwertig darstellt (exkl. die schwarze Kurve, welche alle Gruppen zusammenfasst)



Die analytische Statistik bestätigte mit signifikanten Ergebnissen diese Beobachtung, dass die Lactatproduktion deutlich größer war mit Glucose und nicht Fructose als Energielieferant im Medium ($\sim \Delta$: 0,14-0,64 mg).

In **Tabelle 21** (s. nächste Seite) sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede in der Lactatproduktion und seiner Post-hoc-Analyse - dem zweiseitigen, Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test - dargestellt. Beide Tests wurden für jede Inkubationsphase A-H separat durchgeführt. Post hoc wurden i. R. des U-Tests nur jene Paare verglichen, die sich ausschließlich im eingesetzten Kohlenhydrat unterschieden. Für alle Phasen A-H lieferte der H-Test statistisch signifikante Ergebnisse, sodass die Nullhypothese, dass es keinen Lageunterschied zwischen den Verteilungen der Lactatproduktion aller Gruppen gibt, abgelehnt werden konnte. I. R. des U-Tests war die Verteilung der Lactatproduktion der Fructosegruppe (Spalte I) für jeden Paarvergleich linksverschoben, d. h. die Produktion pro Chip in dieser Gruppe war signifikant kleiner als jene der zweiten, mit Glucose geführten Gruppe (Spalte II). Nur für den Vergleich „Gruppe 2 vs. Gruppe 10“ in Phase G und H konnte diese Alternativhypothese H_{II} nicht, sondern musste die Nullhypothese H_0 angenommen werden. In keinem Fall jedoch war die Produktion in einer Fructose-Gruppe signifikant größer als in ihrem Glucose-Pendant.

Tab. 21: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede in der Lactatproduktion in je einer Inkubationsphase A-H und seiner Post-hoc-Analyse (zweiseitiger, Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test für Paare, die sich im eingesetzten KH unterschieden)

Signifikanzniveaus:

H-Test: $\alpha = 0,05$

U-Test: multiples Signifikanzniveau α' für 4 Paarvergleiche nach der Bonferroni-Korrektur adjustiert:

$$\alpha' = 0,05/4 = 0,0125$$

Legende: χ^2 = Teststatistik des H-Tests (für Stichprobenumfänge $n > 5$ näherungsweise Chi-Quadrat-verteilt (Rudolf and Kuhlisch, p. 336, 2008))

f = Freiheitsgrade

U = Teststatistik des U-Tests

$\sim\Delta$ = geschätzter Lageunterschied zwischen den Verteilungen der Lactatproduktion der beiden verglichenen Gruppen

\rightarrow = Testentscheidung

Fruct / F = Fructose


Gluc / G = Glucose

$H_{A/II}$ = Alternativhypothese

$G > F$ = Lactatproduktion in Gluc-Gruppe > Lactatproduktion in F-Gruppe

E = $\times 10^{\wedge}$

° = aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf $n = 4$ bzw. bei Gruppe 10 in Phase H auf $n = 1$ reduziert (dadurch veränderte, hier nicht genannte kritische Werte für U)

 = Ergebnisse sind signifikant

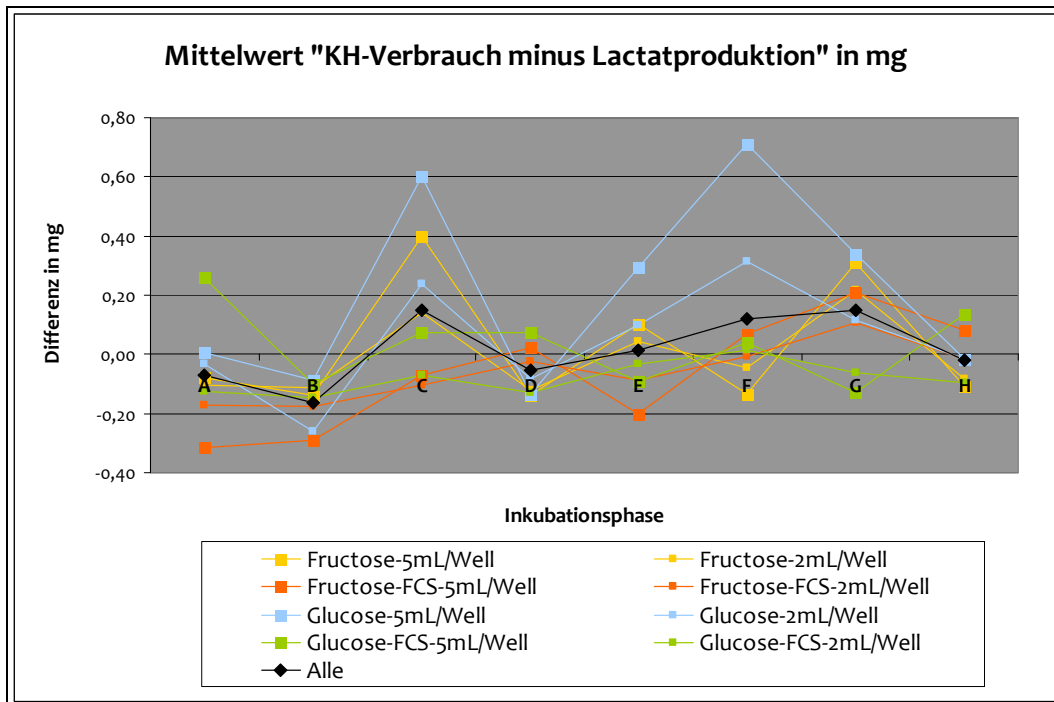
Phase	Paarvergleich		H-Test		U-Test				
	I	vs. II	Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07	p-Wert	Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
			χ^2		U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	\rightarrow
A	1 + 2	9 + 10	74,97	1,45E-13*	0	-0,42	(-0,48) - (-0,33)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,39	(-0,48) - (-0,29)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	3 + 4	11 + 12			6	-0,29	(-0,36) - (-0,19)	2,0E-05*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,47	(-0,56) - (-0,39)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	5 + 6	13 + 14			0	-0,42	(-0,50) - (-0,32)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
B	Fruct	Gluc	84,14	1,97E-15*	0	-0,64	(-0,76) - (-0,50)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	3 + 4	11 + 12			0	-0,48	(-0,59) - (-0,39)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,42	(-0,50) - (-0,32)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	5 + 6	13 + 14			0	-0,24	(-0,27) - (-0,20)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,24	(-0,27) - (-0,20)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$

Tab. 21 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (Lactatproduktion)

Phase	Paarvergleich		H-Test Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07		U-Test Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
	I	vs. II	χ^2	p-Wert	U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	→
C	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	81,46	6,93E-15*	0	-0,51	(-0,61) - (-0,39)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→	0,5	-0,36	(-0,42) - (-0,28)	1,48E-06*	H _{II} G > F
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H _A	0	-0,58	(-0,73) - (-0,47)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			0	-0,34	(-0,41) - (-0,27)	7,4E-07*	H _{II} G > F
D	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	76,25	7,99E-14*	4	-0,41	(-0,55) - (-0,29)	9,62E-06*	H _{II} G > F
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→	0	-0,28	(-0,34) - (-0,23)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H _A	0	-0,48	(-0,59) - (-0,38)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			0	-0,43	(-0,48) - (-0,36)	7,4E-07*	H _{II} G > F
E	2 Fruct	10 Gluc	40,96	8,23E-07*	0	-0,35	(-0,54) - (-0,25)	0,00217*	H _{II} G > F
	4 Fruct	12 Gluc		→	0	-0,3	(-0,34) - (-0,23)	0,00217*	H _{II} G > F
	6 Fruct	14 Gluc		H _A	0	-0,4	(-0,51) - (-0,36)	0,00217*	H _{II} G > F
	8 Fruct	16 Gluc			0	-0,35	(-0,43) - (-0,28)	0,00217*	H _{II} G > F
F	2 Fruct	10 Gluc	40,19	1,16E-06*	0	-0,14	(-0,27) - (-0,08)	0,00217*	H _{II} G > F
	4 Fruct	12 Gluc		→	0	-0,23	(-0,28) - (-0,15)	0,00217*	H _{II} G > F
	6 Fruct	14 Gluc		H _A	0	-0,23	(-0,33) - (-0,18)	0,00217*	H _{II} G > F
	8 Fruct	16 Gluc			0	-0,31	(-0,41) - (-0,25)	0,00217*	H _{II} G > F
G	2 Fruct	10 Gluc	35,2	1,03E-05*	5,5	-0,28	(-0,41) - 0,00	0,043	H ₀
	4 Fruct	12 Gluc		→	0	-0,34	(-0,40) - (-0,14)	0,00217*	H _{II} G > F
	6 Fruct	14 Gluc		H _A	0	-0,49	(-0,69) - (-0,33)	0,01*	H _{II} G > F
	8 Fruct	16 Gluc			0	-0,39	(-0,45) - (-0,31)	0,00217*	H _{II} G > F
H	2 Fruct	10 Gluc	29,28	0,00013*	0	-0,53	(-0,55) - (-0,46)	0,29	H ₀
	4 Fruct	12 Gluc		→	0	-0,36	(-0,45) - (-0,30)	0,01*	H _{II} G > F
	6 Fruct	14 Gluc		H _A	0	-0,48	(-0,65) - (-0,39)	0,01*	H _{II} G > F
	8 Fruct	16 Gluc			0	-0,48	(-0,57) - (-0,34)	0,01*	H _{II} G > F

Zusätzlich zu schon abgehandeltem KH-Verbrauch und Lactatanfall zeigt die folgende Grafik (**Abb. 31**) die Differenz zwischen ersterem und letzterem zu den Zeitpunkten A-H. Auffällig ist, dass die Lactatproduktion in vielen Fällen den erfassten KH-Verbrauch überstieg, sodass dann bei Bildung der Differenz Negativwerte entstanden.

Abb. 31: Verlaufskurven der Differenz zwischen Kohlenhydratverbrauch und Lactatproduktion pro Chip, berechnet für die 48-stündigen Inkubationsphasen A-H, wobei je eine Kurve die Werte aus allen für die jeweilige Phase vorhandenen, unter identischen Experimentalbedingungen akquirierten Mediumproben mittelwertig darstellt (exkl. die schwarze Kurve, welche alle Gruppen zusammenfasst)



Die Kennwerte der deskriptiven Statistik zur Lactatproduktion sowie zur Differenz „KH-Verbrauch minus Lactatproduktion“ während des Versuchs finden sich im Anhang in **Tabellen 20 und 22**.

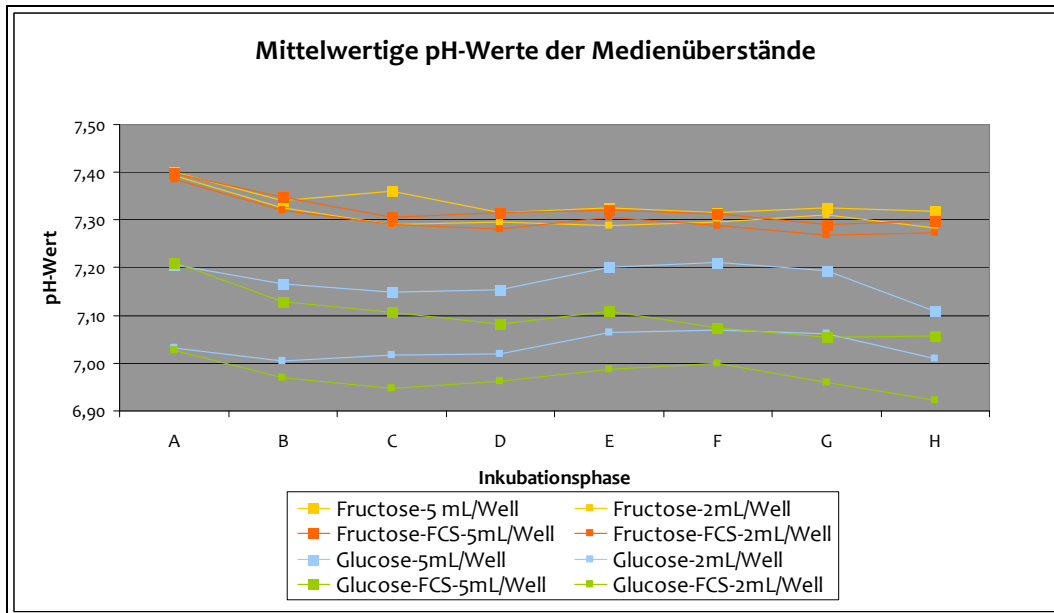
VI.2.1.3 pH-Wert-Verhalten

2 Stunden postum lag der pH-Wert in der Synovialflüssigkeit des verwendeten bovinen Gelenks bei 7,29. Die Kulturmedien waren stets auf einen Wert von 7,4 eingestellt.

Die Verlaufskurven (**Abb. 32** s. nächste Seite) zeigen ein gleichmäßiges pH-Wert-Verhalten innerhalb sämtlicher Gruppen für den gesamten Versuch von Phase A bis H, wobei jedoch deutliche Unterschiede vor allem zwischen den Fructose- und Glucosegruppen auszumachen sind: Während die Fructosemedien sich im Verlauf um den pH-Wert 7,3 bewegten, lagen die pH-Werte in den Glucosemedien nach 48 Stunden Inkubation deutlich darunter zwischen 7,2 und 6,9. Innerhalb der mit Glucose geführten Gruppen fällt des weiteren auf, dass die Gruppen mit mehr Medium pro Well (blaue bzw. grüne Kurve mit großem vs. blaue bzw. grüne mit kleinem Quadrat) einen stabileren, d. h. einen weniger von 7,4 abweichenden pH hatten. Vergleicht man darüber hinaus die Bedingung „FCS vs. kein FCS“ (jeweils blaue vs.

grüne Kurven gleichen Aspekts) wird deutlich, dass Letzteres auch für die mit FCS-freiem Medium versorgten Gruppen gilt.

Abb. 32: Verlaufskurven des pH-Wertes in den Medienüberständen nach den je 48-stündigen Inkubationsphasen A-H, wobei je eine Kurve die Werte aus allen für die jeweilige Phase vorhandenen, unter identischen Experimentalbedingungen akquirierten Mediumproben mittelwertig darstellt



Statistisch signifikante Unterschiede im pH-Wert-Verhalten zwischen Glucose- und Fructosegruppen lieferten H- und U-Test für alle zulässigen Paarvergleiche und sämtliche Inkubationsphasen (mit einer Ausnahme aufgrund kontaminativer Stichprobenreduktion): Der pH-Wert der Fructosemedien war dabei im gesamten Versuchsverlauf ausnahmslos signifikant größer, also näher an den physiologischen 7,4 lokalisiert, als in den Glucosemedien ($\sim \Delta: 0,11-0,39$). Dieses Ergebnis geht Hand in Hand mit den Resultaten der Lactatproduktion, welche in den pH-instabileren Glucosegruppen auch signifikant größer war (vgl. VI.2.1.2).

Das pH-Wert-Verhalten korrelierte daher wie erwartet mit der Lactatproduktion negativ (Pearson's Korrelationskoeffizient: $-0,62$; p-Wert $< 0,05$). D. h. ein hoher Lactatanfall ging mit einem niedrigen pH-Wert einher, was optisch bei Vergleich der Verlaufsgrafiken für Lactat (**Abb. 30** unter VI.2.1.2) und pH-Wert zu bestätigen ist. Ebenfalls negativ korrelierten pH-Wert und KH-Verbrauch.

Die mittelwertigen pH-Wert-Messungen bzw. die Ergebnisse der analytischen Statistik sind in **Tabellen 23** bzw. **24** im Anhang zu finden.

VI.2.2 Nassgewicht zu Versuchsbeginn und -ende

Die prozentuale Gewichtszunahme der nativen Chips lag im Mittel bei 15,1 %, am häufigsten zwischen 0 und 20 Prozent mit Mittelwert und Median bei ca. 15 % bzw. 13,5 %. In 24 Fällen kam es sogar zu einer Abnahme des Nassgewichts. Deskriptiv lassen sich keine Tendenzen hinsichtlich Unterschiede zwischen den Gewichtsentwicklungen der unterschiedlichen

Gruppen erkennen. Vgl. **Tab. 25** und **26** zu klassifizierten Häufigkeiten bzw. statistischen Kennwerten im Anhang.

Dies wurde durch die analytische Statistik bestätigt, die keine signifikanten Ergebnisse generierte (Mann-Whitney-U-Test nach Kruskal-Wallis-(H-)Test: p-Wert $> \alpha' = 0,05/32 = 1,56E-03$ nach Bonferroni-Korrektur). Eine Korrelationsanalyse zeigte eine schwach negative Korrelation von Nassgewichtszunahme und Vitalität (Pearson's Korrelationskoeffizient: -0,04).

VI.3 Kontaminationen

Makroskopisch sahen sämtliche Medien bei den Medienwechseln A bis F klar aus mit z. T. sichtbaren moderaten Farbumschlägen des enthaltenen Phenolrots in Richtung gelb (= saurer pH) im Falle der Glucose-geführten Gruppen. Gleiches gilt für die mikroskopische Beurteilung bei den während der Kultivierung durchgeführten mikroskopischen Kontrollen der Kulturplatten, bei denen auch die Knorpelchips bis auf vereinzelt vom sonst scharf begrenzten Rand her auswachsende Fibroblasten-artige Zellen sowie ihre umgebende Auflagefläche (Boden der Wells) unauffällig und frei von z. B. zellulären Strukturen waren. Dieser Eindruck änderte sich nach 14 Tagen Versuchsdauer bei Mediumwechsel G für Gruppe 14 und bei Wechsel H zusätzlich für die Gruppen 10, 12 und 16: Makroskopisch war ein intensiver Farbumschlag der getrübten Medien in den Wells 10.1/.3-6, 12.2/.4, 14.3/.6, 16.4/.5 nach gelb zu beobachten, mikroskopisch zeigten ebendort massenhaft Zellfragmente und mit Hauthefen vereinbare Strukturen die Kontamination an (Well-Beschriftungssystem s. unter V.2.1.2.2).

Die Werte aus den Analysen dieser Medienüberstände wurden aus der Ergebnisauswertung genommen und die so reduzierten betroffenen Gruppen in den entsprechenden Tabellen mit ° gekennzeichnet (vgl. V.2.5).

VII Diskussion

Bestreben dieser Arbeit war es, das biologische Verhalten bovinen Knorpels *in vitro* hinsichtlich chondrozytären Überlebens und Kohlenhydratmetabolismus unter verschiedenen nutritiven Bedingungen zu beleuchten. Die Interpretation der Ergebnisse orientiert sich an den unter IV formulierten Fragen und Zielsetzungen.

VII.1 Knorpelvitalität

VII.1.1 Histologie und Immunhistochemie

Zur Beurteilung der Zellvitalität disqualifizierte sich im Verlauf der Versuchsauswertungen die TUNEL-Methode, da sie einen nicht tolerierbaren Anteil falsch-positiver Zellen lieferte (vgl. VI.1.1.3). Auch in der Literatur wird von vielen Fällen berichtet, in denen der TUNEL-Test falsch-positive und -negative Resultate zeigt, wobei in ersterem Fall z. B. nekrotische, autolytische oder mitotische Zellen gelabelt werden (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009). Ebenfalls beschrieben wird die generelle Schwierigkeit der zuverlässigen Apoptosedetektion in Chondrozyten, für die kein einzelner ausreichend spezifischer und sensibler Test zur Verfügung steht und daher mindestens zwei Methodiken miteinander kombiniert werden sollten (D'Lima et al., 2004; Gobe, 2009). Zusätzlich zur histomorphologischen Beurteilung der Zellvitalität (s. V.2.3.1 und VI.1.1.1) entschied man sich für die immunhistochemische M30-Methode (s. V.2.3.3 und VI.1.1.2). Die histologische Bewertung wird dabei verbreitet als unersetzbarer Goldstandard in den unterschiedlichsten Kontexten angesehen (Gobe, 2009). Für einen histomorphologischen Score zur Beurteilung des Zellzustands eines Gewebes spricht, dass er ähnlich akkurate Ergebnisse liefert wie die wesentlich teureren und zeitaufwändigeren immunhistochemischen Verfahren zur Apoptosedetektion (i. e. bspw. TUNEL und M30 CytoDEATH®), dabei jedoch schnell und kostengünstig auf Basis klassischer Lichtmikroskopie an HE-gefärbten Gewebeschnitten bestimmbar ist (Belicza, 2009). Es wurde außerdem Rücksprache mit Frau Dr. med. M. Roeßler vom Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg gehalten, wobei man zu dem Schluss kam, dass ein solcher Score auch im Fall des hier verwendeten Biomaterials von großer Bedeutung, sinnvoll erstellbar und praktikabel sei.

Nach 8 Tagen Inkubation waren noch bis zu 83 % der Zellen, nach 16 Tagen bis zu 76 % der Chondrozyten in den Knorpelchips vital - ein Ergebnis, welches gut vereinbar ist mit der von Moo et al. (2011) unter Messung von Kollagendegeneneration und Proteoglykangehalt konstatierten Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität boviner Knorpelimplantate über einen Versuchszeitraum von bis zu 17 Tagen bei ebenfalls 48-stündigen Mediumwechseln.

Weder i. R. der histomorphologischen noch immunhistochemischen (M30-CytoDEATH®) Beurteilung der kultivierten Knorpelchips lieferte die analytische Statistik signifikante Ergebnisse mit Unterschieden, welche eine bestimmte experimentelle Kultivierungsbedingung hinsichtlich eines höheren Anteils vitaler Zellen in den Explantaten favorisieren

würden. Daher können die von *Chua et al. (2005)* für eine chondrozytäre Monoschicht-Gewebezüchtung geforderten 2 % (V/V) FCS in Kombination mit 1 % (V/V) ITS für eine bovine Explantatkultur nicht als vitalitätsfördernd eingestuft werden.

Deskriptiv zeigte sich wie erwartet in den nicht kultivierten Kontrollen ein höherer Anteil histomorphologisch vitaler Zellen als in allen Versuchsgruppen und auch die Vitalität der 8 Tage inkubierten Gruppen war größer als in den doppelt so lang kultivierten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Chondrozyten im Laufe der Versuchsdauer in zunehmender Zahl apoptotisch wurden und nicht z. B. alle im Zuge der durch die Gewebeentnahme verursachten Irritation.

Die bei mikroskopischer Auswertung der M30-CytoDEATH®-gefärbten Gewebeschnitte häufig beobachtete Anordnung positiv markierter Zellen in Clustern, bei der ganze Chondrone, apoptotisch waren, spricht für eine Synchronizität des programmierten Zelltods in benachbarten Zellen, welche z. B. auch *Gobe (2009)* an renalem Gewebe beobachten konnte. M30-CytoDEATH®-positive Zellen waren außerdem häufig histomorphologisch unverändert, wären also in der HE-Färbung als vital kategorisiert worden. Da die verwendete immunhistochemische Methode das in der Initialphase der Apoptose auftretende M30-Epitop markiert und so vor allem Zellen der Frühapoptose erkennt, wenn es noch nicht zwingend zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen gekommen ist (*Leers et al., 1999*), ist diese Beobachtung erklärbar, führt aber zu widersprüchlichen Ergebnissen der beiden Methoden, wenn davon ausgegangen wird, dass beide herangezogenen Verfahren zur Detektion von zellulärer Vitalität den kompletten Vorgang der Apoptose abdecken. Die deutlich unterschiedlichen Resultate hinsichtlich der Kontrollgruppenvitalität z. B., die nach der histomorphologischen Methode größer ist als nach dem immunhistochemischen Verfahren, beruhen wahrscheinlich auf dem Eintritt einiger Chondrozyten während bzw. direkt nach der Biopsie in die Frühapoptose aufgrund der Manipulation am Gewebe. Diese Zellen sind dann in den direkt nach der Biopsie fixierten Kontrollen M30-positiv, jedoch - da früh-apoptotisch - histomorphologisch unverändert, werden also nur immunhistochemisch als avital kategorisiert. Solche früh-apoptotischen Zellen, wenn sie zu einer kultivierten Versuchsgruppe gehörten, waren nicht zwangsläufig dem Zelltod geweiht, sondern hätten von der in diesem Stadium der Apoptose möglichen Reversibilität (*Geske et al., 2001*) profitieren, weiterleben und so dem eigenen Suizidprogramm entgehen können, um zu Versuchsende weder mit der einen noch der anderen Methode als apoptotisch nachweisbar zu sein. Andererseits waren in den Versuchsgruppen auftretende histomorphologisch spät-apoptotische oder nekrotische - also avitale - Zellen, Methoden-spezifisch M30-negativ gelabelt (*Leers et al., 1999*) und wurden daher in der immunhistochemischen Beurteilung nicht als avital eingestuft, da sie die früh-apoptotischen Phasen schon durchlaufen hatten. So könnte auch die im Vergleich zur immunhistochemischen geringere histomorphologische Vitalität der kultivierten Gruppen begründet werden. Vgl. **Abb. 26** unter VI.1.1.2.

In der Histomorphologie wurden fast keine nekrotischen Zellen gefunden, was für einen primär geregelten Zelltod i. R. der Apoptose spricht wie er auch schon von *Patwari et al.* (2004) als in bovinem Knorpel vorherrschend angenommen wurde.

VII.1.2 LDH-Release

Da LDH als bekannter Zelltodmarker auch für das Messen chondrozytärer Vitalität weithin - bspw. bei *Nishimuta and Levenston* (2012) und *Tomomura et al.* (2006) - eingesetzt wird, außerdem invers mit der histomorphologisch ermittelten Zellvitalität korrelierte (vgl. VI.1.2) und weder während des Versuchs bei mikroskopischen Kontrollen die Explantate noch später i. R. der Versuchsauswertung die mikroskopierten Gewebeschnitte Hinweise auf die Präsenz phagozytischer Zellen lieferten, ist davon auszugehen, dass das freigesetzte LDH aus der Zelllyse (spät-)apoptotischer - welche *in vivo* normalerweise prä-lytisch von z. B. Makrophagen aufgenommen werden (*Kerr et al.*, 1972) - und nekrotischer Zellen stammt.

Der Vergleich der Mengen des über die gesamte Versuchsdauer akkumulierten LDH ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass auch auf dieser Methode basierend keine Experimentalbedingung als vorzüglich für das Knorpelzellüberleben in Kultur angesehen werden kann.

Die Ergebnisse des kumulativen LDH-Release stützen die unter VII.1.1 formulierte Annahme, dass im Versuchsverlauf immer mehr Zellen lytisch wurden, da die Freisetzung in sämtlichen 16-tägig geführten Gruppen größer ist als in den nur 8-tägig und ansonsten unter identischen Bedingungen kultivierten.

Da die Lactatdehydrogenase zu jedem Mediumwechsel-Zeitpunkt bestimmt wurde, bot sich die Möglichkeit das Zellsterben im Versuchsverlauf zu beobachten, wobei ein vermehrter Tod zwischen Tag 6 und 8 sowie in geringerem Maße zwischen Tage 10 und 12 und dies vor allem in den mit FCS versorgten Gruppen festzustellen war. Die Werte für die Inkubation während der letzten vier Versuchstage vermitteln außerdem den Eindruck eines zum Versuchsende hin absteigenden Verlaufs der LDH-Freisetzung, was für ein Einpendeln des Zellsterbens auf niedrigem Niveau aufgrund Adaption an die Kulturbedingungen sprechen könnte. Alternativ ist denkbar, dass nach 14 bzw. 16 Tagen Kultivierung alle Zellen, die nicht mit den Kulturbedingungen zu Recht kamen, apoptotisch bzw. nekrotisch wurden und dann nur noch die resistenteren Varianten übrig waren.

Des Weiteren fiel auf, dass die in 5 mL Medium mit Glucose und ohne FCS inkubierten Knorpel den gleichmäßigsten und insgesamt auf niedrigstem Niveau stattfindenden Verlauf des LDH-Release aufwiesen, was sich gut vereinbaren lässt mit der histomorphologisch bestimmten Vitalität in der 8-tägig inkubierten Gruppe dieser Kultivierungsbedingung, die nämlich das Überleben in allen anderen Versuchsgruppen übertraf.

Der hohe LDH-Gehalt in der Synovialflüssigkeit des bioptierten Gelenks bei relativ hoher histomorphologischer Knorpelzellvitalität spricht für ein Sterben vor allem der Zellen umgebender Gelenkstrukturen wie z. B. der Synovialmembran *postum*.

VII.2 Chondrozytärer Metabolismus

VII.2.1 Kohlenhydratverbrauch

Die in den Nährmedien enthaltenen Kohlenhydrate Glucose bzw. Fructose wurden innerhalb von 48 Stunden nur zu einem Bruchteil, maximal zu 26 %, von den Knorpelimplantaten ausgeschöpft. Dies kann einerseits auf einen niedrigen tatsächlichen Bedarf zurückzuführen sein. Andererseits könnte Glutamin eine tragende Rolle als Energielieferant gespielt haben wie dies schon bei Zielke *et al.* (1984) für Säugerzellen beschrieben, auf einen Anteil von 30-50 % beziffert wurde und sogar die primäre Energiequelle darstellen konnte, wenn Glucose durch einen anderen Zucker ersetzt wurde. Glucose und Glutamin beeinflussen sich außerdem wechselseitig: Wird ersteres in höherem Maße verbraucht, wird die Verstoffwechslung der Aminosäure herunterreguliert bzw. *vice versa* (Barngrover *et al.*, 1985).

Bei der Untersuchung der verschiedenen Versuchsgruppen auf statistisch signifikante Unterschiede im Kohlenhydrat(KH-)verbrauch zeigte sich eine höhere Ausschöpfung durch die mit Glucose versorgten Explantate als durch die Chips unter Fructoseeinfluss und ansonsten identischen Kulturbedingungen. Dies spricht für einen aktiveren Energiestoffwechsel und somit größeres biosynthetisches Potential unter Inkubation mit Glucose. Auch die maximal verbrauchte KH-Menge wurde in einer Glucosegruppe gemessen, und zwar für jene, die dabei in 5 mL ohne FCS-Zusatz kultiviert wurde und auch die größte Vitalität nach Versuchsende aufwies (s. o. unter VI.1.1.1, vgl. VII.1.1 und VII.1.2). Dennoch ist bemerkenswert, dass es überhaupt zu einer Verstoffwechslung von Fructose durch die Chondrozyten kam. Dies galt zuvor zwar als wahrscheinlich möglich aufgrund der Präsenz des Fructosetransporters GLUT5 in Knorpelzellen (Ohara *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2003), war jedoch in der Literatur nie explizit beschrieben worden. Denkbare Erklärungen für den Verbleib des Fruchtzuckers sind folgende: *In vivo* wird Fructose primär in der Leber in die Glykolyse eingeschleust und so dem Energiestoffwechsel zugänglich gemacht, extrahepatisch - wie im Fall der Knorpelimplantate - ist dies über den Polyolweg möglich (Koolman and Röhm, 2003). Außerdem kann Fructose über den oxidativen Weg des Pentosephosphatwegs im Zytosol der meisten Zellen verstoffwechselt werden. Reitzer *et al.* (1979) berichteten sogar, dass von kultivierten HeLa-Zellen 90 % der Fructose so verstoffwechselt werden und nur ein sehr geringer Teil glykolytisch verwendet wird. Darüber hinaus steht Fructose als Ketohexose mit den Aldohexosen Glucose und Mannose in wässriger, schwach alkalischer Lösung (pH der verwendeten Nährmedien: 7,4) i. R. der Ketol-Endiol-Tautomerie im Gleichgewicht und kann über die Umwandlung in Glucose der Glykolyse zugeführt und so aus dem Medium entfernt, also „verbraucht“ worden sein (Boeck, 2003).

Signifikanzen ergaben sich auch beim Vergleich der den Knorpelchips angebotenen Nährmediummenge mit einer Überlegenheit hinsichtlich des Mehrangebots von 5 mL im Vergleich zu nur 2 mL pro Well. Dies ist konkordant mit dem in einschlägiger Literatur beschriebenen metabolischen Verhalten bovinen Knorpels, der mehr KH verbraucht, wenn ihm mehr zur Verfügung steht (Heywood *et al.*, 2010; Lee and Urban, 1997).

Für den Vergleich „FCS vs. kein FCS im Medium“ wurden ebenfalls signifikante Unterschiede gefunden jedoch mit differierenden Entscheidungsrichtungen, sodass der Einsatz von FCS auch hinsichtlich einer Stimulation der metabolischen Aktivität wiederum nicht uneingeschränkt als positiv, zumindest jedoch - anders als bei *Chua et al. (2005)* und *Yang and Barabino (2011)* - als nicht notwendig in ITS-supplementierten Knorpelkulturen eingestuft werden kann.

VII.2.2 Lactatproduktion

Lactatproduktion und KH-Verbrauch korrelierten positiv miteinander, d. h. ein höherer Zuckerverbrauch ging auch mit einem größeren Aufkommen von pH-senkendem Lactat einher. Besonders groß und statistisch signifikant war der Unterschied in der Lactatproduktion zwischen Gruppen, die sich nur im eingesetzten Kohlenhydrat unterschieden („Glucose vs. Fructose“), wobei unter Glucose Lactat in deutlich höherem Maße produziert wurde. Die hiesigen Ergebnisse bestätigen somit die allgemeine Annahme, dass in Knorpel Glucose vor allem über die Glykolyse metabolisiert und Lactat das Hauptendprodukt dieses Stoffwechsels darstellt (*Lee and Urban, 1997*).

Auffällig ist jedoch, dass die Lactatbildung den KH-Verbrauch in allen Experimentalgruppen z.T. übertraf, was darauf hindeutet, dass neben den gemessenen verbrauchten KH-Mengen andere Substrate Eingang in die Glykolyse fanden. Dies war wahrscheinlich, wie unter VII.2.1 erläutert, aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Aminosäuren hohen Konzentration im Medium primär Glutamin, welches bei *Reitzer et al. (1979)* in einem Versuch mit HeLa-Zellen zu 13 % zu Lactat metabolisiert wurde. Die in den Fructosegruppen geringe Lactatproduktion beruhte einerseits auf dem geringen Fructoseverbrauch und andererseits wohl auf alternativer Verstoffwechslung der Fructose außerhalb der Glykolyse i. R. des Pentosephosphatwegs, wie dies *ibidem* als vorherrschende Variante beschrieben wurde (vgl. VII.2.1).

VII.2.3 pH-Wert-Verhalten

Das pH-Wert-Verhalten der Nährmedien zeigte sich im Versuchsverlauf bei allen Experimentalgruppen schwankungsarm. Dies galt allerdings je nach eingesetztem Medientyp auf unterschiedlichen pH-Niveaus: Der pH-Wert in den Fructosegruppen war stets signifikant näher an den bei Präparation der Medien eingestellten und physiologischen 7,4 (*van den Berg, 2003*) als in den Glucosegruppen. Damit korrelierten auch die signifikant geringere Lactatproduktion sowie der geringere KH-Verbrauch in eben jenen mit Fructose geführten Gruppen. Lactat als Hauptendprodukt der kartilaginären Glykolyse (*Lee and Urban, 1997*) und generell Hauptquelle nichtvolatiler Säureäquivalente kultivierter Säugerzellen (*Imamura et al., 1982*) zeichnete also hauptverantwortlich für pH-Wert-Abweichungen nach sauer. Der stabile pH-Wert unter Fructose lässt sich damit einerseits auf den geringen Verbrauch, die konsekutiv geringe Lactatproduktion sowie auf die mögliche Alternativverstoffwechslung i. R. des

Pentosephosphatwegs (Reitzer et al., 1979) zurückführen und wurde allgemein für die Kultur humaner nicht-chondrozytärer Zellen ja schon von vielen Autoren berichtet (Barngrover et al., 1985; Eagle et al., 1958; Imamura et al., 1982; Melnykovich and Bishop, 1972).

VII.2.4 Entwicklung des Nassgewichts

Während bei Moo et al. (2011) in einem Versuch unter ähnlichen Bedingungen (Kultivierung boviner Knorpelimplantate bis zu 17 Tage in einem DMEM-Medium mit FCS) Nassgewichtstabilität beobachtet wurde, kam es in hiesigem Experiment zu Schwankungen des Nassgewichts der Implantate. Im Vergleich zum Ausgangsgewicht wurden sowohl Gewichtszunahmen als auch, weniger häufig, -abnahmen beobachtet ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Ein Anstieg lässt sich entweder durch die Einlagerung produzierter Matrixbestandteile oder wässriger Mediumbestandteile erklären. Eine Korrelationsanalyse, in der Nassgewichtszunahme und Vitalität negativ korreliert waren, zeigte zudem, dass eine positive Nassgewichtsentwicklung keinen Surrogatparameter für höhere Knorpelvitalität darstellt. Das Nassgewicht erlaubt somit keinerlei Rückschluss auf metabolische Aktivität oder Vitalität der Chondrozyten.

VII.3 Limitationen

Hinsichtlich des verwendeten Biomaterials ist eine gute Vergleichbarkeit der in diesem Experiment generierten Ergebnisse zu den Befunden der Versuche zahlreicher anderer, in dieser Arbeit zitierter Autoren gegeben, da sie ebenfalls mit Rinderbioplaten arbeiteten. Trotz Unterschieden in Histologie, Geometrie und Mechanorespons (Rieppo et al., 2003; Taylor et al., 2012) ist es sinnvoller Usus, tierischen Knorpel als Forschungsmaterial zu verwenden. Neben der guten Verfügbarkeit und der großen utilisierbaren Materialmenge pro Gelenk sprach für bovinen Knorpel die im Vergleich zu anderen Spezies dem menschlichen Knorpel ähnlichste Gewebedicke sowie vergleichbare Zelldichte (Stockwell, 1978; Taylor et al., 2012) und histologische Geometrie (Rieppo et al., 2003) (vgl. III.2.2). Natürlich lassen sich die Resultate jedoch aufgrund der Materialdifferenzen nicht ohne Vorbehalte auf menschlichen Knorpel übertragen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass z. T. Knorpel eher peripherer Gelenkbereiche zum Einsatz kam. Dieser ist geringerer mechanischer Belastung ausgesetzt, somit seltener aufgrund traumatischer Läsionen klinisch relevant, konsekutiv auch für wissenschaftliche Untersuchungen bedeutungsärmer und auch nicht ohne Weiteres auf das Kultivierungsverhalten mechanisch stärker beanspruchten Knorpels übertragbar.

Auf die Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse wirkt auch der Versuchsaufbau an sich z. T. limitierend, sodass die Resultate im Kontext seiner experimentellen Bedingungen bewertet werden sollten: Zum einen wurde die Kultivierung unter einer für Knorpel unnatürlich hohen atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von anteilig 21 % am Gesamtgasdruck durchgeführt, während in Synovialflüssigkeit ein höchstens halb so großer pO_2 enthalten ist (Lee and Urban, 1997; Lund-Olesen, 1970). Die chondrozytären

biosynthetischen Aktivitäten werden unter der reduzierten O_2 -Konzentration optimal sichergestellt, während sie ein höherer Gehalt hemmt (Qu et al., 2009). Da jedoch die Auswertung der vorliegenden Studie primär eine Analyse der Knorpelvitalität und -kohlenhydratstoffwechselaktivität ohne Augenmerk auf Kollagensynthese etc. vorsah, sind verfälschende Auswirkungen durch einen unphysiologisch hohen Sauerstoffpartialdruck wohl gering, zumal laut Das et al. (2010) Glucoseverbrauch und Lactatproduktion nicht vom pO_2 abhängen. Zum anderen wurde eine statische Kultur geführt, bei der die Knorpelimplantate keiner mechanischen Belastung ausgesetzt waren, welche *in vivo* in vielerlei Hinsicht für das Gewebe und gerade hinsichtlich der Nährstoffverteilung bis in die tiefen Schichten essentiell ist (Maroudas and Bullough, 1968). Einer Minderversorgung der Zellen in bestimmten Knorpelbereichen vorbeugend wirkte, dass die Implantate in ihren Inkubationswells von allen Seiten, auch von der *in vivo* knochennahen, von Nährmedium umspült waren. Dennoch kann die fehlende Belastung Knorpel schaden, da die lokomotorische Gelenkaktivität neben der nutritiven Distribution noch zahlreiche andere wichtige Funktionen erfüllt: So besitzen Chondrozyten z. B. kurze Zilien und spezifische Rezeptoren, um u. a. mechanische Signale empfangen, so mit der Extrazellulärmatrix kommunizieren und die Gewebekompostase aufrechterhalten zu können (vgl. III.3.3) (Buckwalter and Mankin, 1997; Stockwell, 1991). Die Bedeutung mechanischer Belastung unterstreicht auch eine Studie von Iqbal et al. (2012), bei der eine 4-wöchige Gelenkimmobilisation zu Knorpeldegeneration führte, während die anschließende Remobilisation eine Regeneration zur Folge hatte.

Zur Beurteilung der Knorpelzellviabilität sollten in vorliegendem Fall primär die Ergebnisse der histomorphologischen Kategorisierung aufgrund ihrer bereits in Abschnitt VII.1.1 besprochenen allgemeinen Vorzüge, der unter VI.1.1.2 dargestellten und unter VII.1.1 diskutierten widersprüchlichen Ergebnisse der M30-CytoDEATH®-Methode sowie des Versagens der TUNEL-Methode (vgl. VI.1.1.3 und VII.1.1) herangezogen werden.

Die Aussagekraft der Ergebnisse der deskriptiven und analytischen Statistik ist insofern herabgesetzt, als dass die Umfänge der einzelnen Stichproben, i. e. Versuchsgruppen, sehr klein waren.

VII.4 Fazit

Die unter IV formulierten Fragestellungen lassen sich wie folgt beantworten:

1. Ist in einer statischen Kultivierung boviner Knorpelimplantate der Zusatz von FCS zum Nährmedium wirklich notwendig oder reicht ITS aus, um chondrozytäre Vitalität und Stoffwechselaktivität zu gewährleisten?

Der Einsatz von FCS zusätzlich zu ITS in einer statischen Kultur boviner Knorpelimplantate ist weder geeignet einen Überlebensvorteil der Chondrozyten noch eine höhere Aktivität ihres Kohlenhydratstoffwechsels zu bewirken, hat jedoch dahingehend auch keine negativen Konsequenzen.

Für Folgeversuche mit gleichem Biomaterial wäre damit der Einsatz von 1 % (V/V) ITS zu empfehlen, der von FCS jedoch aufgrund der bekannten Risikoerhöhung für zelluläre Dedifferenzierungsprozesse sowie möglicherweise weiterer schwer kontrollierbarer Einflüsse eventuell unbekannter Inhaltsstoffe nicht (Lindl and Gstraunthaler, p. 88-94, 2008; Narcisi et al., 2012). Denn die für Monoschichtkulturen (Chua et al., 2005) und Gewebezüchtungen (Yang and Barabino, 2011) berichteten Proliferationsvorteile konnten in diesem Versuch unter den gegebenen Bedingungen nicht bestätigt werden. Eine Konzentration von 10-20 % (V/V) FCS wie sie zur Kultivierung von bovinen Knorpelexplantaten von einigen Forschungsgruppen, z. B. Moo et al. (2011) oder Ramakrishnan et al. (2011), eingesetzt wurde, erscheint demnach wesentlich zu hoch gewählt.

2. Eignet sich Fructose als Glucose *in vitro* ersetzendes Energiesubstrat für Knorpelzellen? Wie wirkt sich ihr Einsatz auf Überleben und Energiestoffwechsel der Chondrozyten aus? Und wird eine höhere pH-Wert-Stabilität im Kulturmedium gewährleistet während der 48 Stunden zwischen zwei Mediumwechseln aufgrund geringerer Lactatproduktion im Vergleich zur Verwendung von Glucose?

Fructose eignet sich als Energiesubstrat für Chondrozyten ohne sich signifikant auf die Knorpelvitalität auszuwirken. Ihr zu Glucose alternativer Einsatz führt zu einer geringeren Lactatproduktion, einem damit einhergehenden von den physiologischen 7,4 weniger abweichenden pH-Wert der Kulturmedien während der einzelnen Inkubationsphasen und bestätigt somit, was für die Kultivierung anderer Säugetierzellen bereits bekannt war (vgl. III.3.2.1 und VII.2).

Wie von Ohara et al. (2001) aufgrund der chondrozytären Expression des Fructosetransporters GLUT5 vermutet, kann Fructose Knorpel also als Energiequelle dienen und Glucose in bovinen Knorpelkulturen ersetzen. So könnten die potentiell zelltoxische Wirkung von Glucose (Lorenzi et al., 1985; Russell, 1993) und die in der Literatur berichteten negativen Auswirkungen auf metabolische und matrixsynthetisierende Aktivität humaner und boviner Chondrozyten sowie auf die Geometrie der Knorpelmatrix durch pH-Wert-Minderung (Bhosale and Richardson, 2008; Das et al., 2010; Gray et al., 1988; Schwartz et al., 1976; Wu et al., 2007) vermieden werden. Dennoch ist zu erwähnen, dass sich unter dem Aspekt der Vitalität auch keine Nachteile für die Zellen der Glucosegruppen zeigten. Die Aktivität des Kohlenhydratstoffwechsels in diesen Gruppen war sogar signifikant größer. Somit scheint Lactat für Chondrozyten nicht toxisch zu sein und auch den Energiestoffwechsel durch Ansäuerung des Mediums nicht zu beeinträchtigen.

3. Sind 2 mL der eingesetzten Kulturmedien pro Explantat und 48 h ausreichend oder bringt das in 5 mL enthaltene Mehrangebot an Kohlenhydrat und anderen Nutritiven einen Überlebensvorteil? Wirkt sich die Höhe des Nährstoffangebots auf die metabolische Aktivität bovinen Knorpels aus?

2 mL aller eingesetzten Kulturmedienvarianten pro Explantat bei 48-stündigen Wechselintervallen reichten voll aus, um die Knorpelbioplate zu kultivieren. Ein Mehrangebot von Nutritiven (5 mL) führte zu keiner signifikanten Steigerung des Überlebens, wohl aber zu einer Erhöhung des Kohlenhydratmetabolismus.

Letzteres geht jedoch lediglich mit vermehrter Lactatproduktion und konsekutiver pH-Wert-Erniedrigung einher. Aufgrund der geringen Ausschöpfung von maximal ca. einem Viertel des angebotenen Kohlenhydrats ließe sich die Zuckerkonzentration in Zukunft sogar um mindestens zwei Drittel auf 1,9 mmol/L bzw. 0,33 mg/L reduzieren, zumal außerdem Glutamin als wahrscheinlich genutzte Energiequelle zur Verfügung stand (vgl. VII.2.1/.2).

Ergo ist eine statische Kultivierung boviner Knorpelimplantate in einem Fructose-haltigen DMEM-Medium ohne FCS und Glucose über einen langen Zeitraum von 16 Tagen unter Wahrung der Gewebeviabilität möglich.

Meines Wissens neu ist die Erkenntnis, dass Chondrozyten Fructose als Energiesubstrat nutzen können.

VII.5 Ausblick

Hinsichtlich Praktikabilität war die Durchführung des in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsplans problemlos möglich. Einziges Manko waren vereinzelt auftretende Kontaminationen (vgl. VI.3).

Für Folgeversuche ist allerdings eine Erhöhung der Stichprobengrößen der einzelnen Versuchsgruppen anzustreben, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen (auf $n \approx 40$ pro Gruppe, je nach Fragestellung). Außerdem wäre zur Einschätzung der Zellviabilität sicherlich eine Kombination der histomorphologischen Kategorisierung sowie der beiden immunhistochemischen Methoden M30 CytoDEATH® und TUNEL empfehlenswert, da damit einerseits verschiedene Stadien der Apoptose abgedeckt werden würden (vgl. V.2.3.3) und andererseits aufgrund der schwierigen Zelltoddetecktion an Knorpel i. A. (D'Lima et al., 2004) eine methodisch breitere Abdeckung indiziert erscheint. Die erfolgreich eingesetzte zusätzliche Messung der LDH-Freisetzung als Parameter für Zelllyse, ergo -tod - u. a. auch von Nishimuta and Levenston (2012) sinnvoll an Knorpelgewebe eingesetzt - sollte nicht entfallen.

Ergänzend schlage ich zur Erfassung des Energiestoffwechsels zusätzlich zur Messung von KH-Verbrauch und Lactatproduktion noch die Registrierung eines eventuellen Glutaminverbrauchs bzw. wie bei Moreira Teixeira et al. (2012) einer i. R. dessen stattfindenden Ammoniakproduktion vor, um zu klären, ob die Aminosäure Glutamin wie angenommen Eingang in den Metabolismus der Knorpelimplantate fand (vgl. VII.2.1/.2).

Außerdem wäre eine Erfassung der Gewebeintegrität und der Biosynthese bzw. Degradation von Matrixbestandteilen zweckmäßig um das Verhalten von Knorpel in Kultur als Ganzes zu beleuchten. So ließe sich eruieren, ob FCS auch dann überflüssiger und Fructose sinnvoller Nutritionszusatz ist, wenn neben Zellvitalität Matrixproduktion und -abbau und die Integrität der Knorpelgewebegeometrie im wissenschaftlichen Fokus stehen.

Weitere interessante zukünftige Fragestellungen, könnten z. B. klären, ob sich die hier dargestellten Ergebnisse auch für eine Kultur in einer Umgebung auf physiologische Werte reduzierten Sauerstoffpartialdrucks oder unter mechanischer Belastung der Knorpel-explantate bestätigen. Eine Untersuchung über einen längeren Zeitraum könnte feststellen, ob es mit länger wählender Kultivierung zu kontinuierlich steigendem Anteil avitaler Zellen oder aber einer Stabilisierung des Zellsterbens kommt, wie in diesem Versuch angedeutet zu beobachten war (vgl. VII.1.2).

VIII Literatur

1. Abbot AE, Levine WN, Mow VC (2003) Biomechanics of the Articular Cartilage and Menisci of the Adult Knee. In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, Simonian PT, Wickiewicz TL (eds) *The Adult Knee*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p 98
2. Adams JM (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17:2481-2495
3. An YH, Gruber HE (2003) Introduction to Experimental Bone and Cartilage Histology. In: An YH, Martin KL (eds) *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Humana Press, Totowa, New Jersey, p 16
4. Arøen A, Løken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, Engebretsen L (2004) Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 32:211-215
5. Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, Schiessel R, Ogris E, Hinterberger W, Hamilton G (2009) Circulating cytokeratin 18 fragment m65-a potential marker of malignancy in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Surg* 13:2020-2026
6. Aydelotte MB, Kuettner KE (1988) Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* 18:205-222
7. Bais R, Philcox M (1994) Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase (L-Lactate: NAD⁺Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32:639-655
8. Barham D, Trinder P (1972) An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97:142-145
9. Barngrover D, Thomas J, Thilly WG (1985) High density mammalian cell growth in Leibovitz bicarbonate-free medium: effects of fructose and galactose on culture biochemistry. *J Cell Sci* 78:173-189
10. Belicza M (2009) [Evaluation of morphologically determined apoptotic index]. *Acta Med Croatica* 63 Suppl 2:3-12
11. Bhosale A, Richardson J (2008) Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87:77-95
12. Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL (2007) A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater* 13:26-39
13. Boeck G (2003) *Chemie wichtiger Naturstoffklassen. Kurzlehrbuch Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 172-173
14. Bonasia DE, Martin JA, Marmotti A, Amendola RL, Buckwalter JA, Rossi R, Blonna D, Adkisson HD, Amendola A (2011) Cocultures of adult and juvenile chondrocytes compared with adult and juvenile chondral fragments: in vitro matrix production. *Am J Sports Med* 39:2355-2361
15. Bos PK, Kops N, Verhaar JA, van Osch GJ (2008) Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *Osteoarthritis Cartilage* 16:204-211

16. Boxberger HJ (2006) Nährmedien für die Zellkultur. Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, p 92
17. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Shortkroff S, Spector M (2001) Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res* 19:482-492
18. Buckwalter JA, Mankin HJ (1997) Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 79:12
19. Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138:1379-1394
20. Chu CR, Coutts RD, Yoshioka M, Harwood FL, Monosov AZ, Amiel D (1995) Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study. *J Biomed Mater Res* 29:1147-1154
21. Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH (2005) Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater* 9:58-67; discussion 67
22. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16
23. Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 147:1109-1122
24. D'Lima DD, Kuhn K, Lotz MK (2004) Detection of Apoptosis in Cartilage *In Situ* and in Isolated Chondrocytes. In: Sabatini M, Pastoureau P, De Ceuninck F (eds) *Cartilage and Osteoarthritis, Cellular and Molecular Tools*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 275-289
25. Das R, van Osch G, Kreukniet M, Oostra J, Weinans H, Jahr H (2010) Effects of individual control of pH and hypoxia in chondrocyte culture. *J Orthop Res* 28:537-545
26. Davies DV, Edwards DA (1948) The blood supply of the synovial membrane and intra-articular structures. *Ann R Coll Surg Engl* 2:142-146
27. DiMicco MA, Sah RL (2001) Integrative cartilage repair: adhesive strength is correlated with collagen deposition. *J Orthop Res* 19:1105-1112
28. Eagle H, Barban S, Levy M, Schulze HO (1958) The utilization of carbohydrates by human cell cultures. *J Biol Chem* 233:551-8
29. Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4:30-35
30. Feng J, Melcher AH, Brunette DM, Moe HK (1977) Determination of L-ascorbic acid levels in culture medium: concentrations in commercial media and maintenance of levels under conditions of organ culture. *In Vitro* 13:91-99
31. Fisher AG (1939) Synovial Membrane and Articular Cartilage. *Br Med J* 2:390-393
32. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501
33. Geske FJ, Lieberman R, Strange R, Gerschenson LE (2001) Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ* 8:182-191

34. Gilbert SJ, Singhrao SK, Khan IM, Gonzalez LG, Thomson BM, Burdon D, Duance VC, Archer CW (2009) Enhanced tissue integration during cartilage repair in vitro can be achieved by inhibiting chondrocyte death at the wound edge. *Tissue Eng Part A* 15:1739-1749
35. Gobe G (2009) Identification of apoptosis in kidney tissue sections. *Methods Mol Biol* 466:175-192
36. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC (1988) Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 6:777-792
37. Green WT (1977) Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Relat Res*:237-250
38. Hata R, Senoo H (1989) L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 138:8-16
39. Hauser K (2008) Vitamine. Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p 304
40. Heir S, Nerhus T, Røtterud J, Løken S, Ekeland A, Engebretsen L, Arøen A (2009) Focal Cartilage Defects in the Knee Impair Quality of Life as Much as Severe Osteoarthritis: A Comparison of Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score in 4 Patient Categories Scheduled for Knee Surgery. *Am J Sports Med*
41. Heywood H, Knight M, Lee D (2010) Both superficial and deep zone articular chondrocyte subpopulations exhibit the Crabtree effect but have different basal oxygen consumption rates. *J Cell Physiol* 223:630-639
42. Hills GM (1940) The metabolism of articular cartilage. *Biochem J* 34:1070-1077
43. Hunter W (1995) Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*:3-6
44. Imamura T, Crespi CL, Thilly WG, Brunengraber H (1982) Fructose as a carbohydrate source yields stable pH and redox parameters in microcarrier cell culture. *Anal Biochem* 124:353-358
45. Iqbal K, Khan Y, Minhas LA (2012) Effects of immobilization on thickness of superficial zone of articular cartilage of patella in rats. *Indian J Orthop* 46:391-394
46. Jenkins LL, Burg KJL (2003) Tissue Harvesting and Fixation. In: An YH, Martin KL (eds) *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 144 - 148
47. Jensen LT, Henriksen JH, Olesen HP, Risteli J, Lorenzen I (1993) Lymphatic clearance of synovial fluid in conscious pigs: the aminoterminal propeptide of type III procollagen. *Eur J Clin Invest* 23:778-784
48. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
49. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW (2008) Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater* 16:26-39
50. Khan IM, Bishop JC, Gilbert S, Archer CW (2009) Clonal chondroprogenitors maintain telomerase activity and Sox9 expression during extended monolayer culture and retain chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage* 17:518-528

51. Kim TK, Sharma B, Williams CG, Ruffner MA, Malik A, McFarland EG, Elisseeff JH (2003) Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11:653-664
52. Knudson W, Loeser RF (2002) CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 59:36-44
53. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K (2012) Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res* 347:613-627
54. Koolman J, Röhm K-H (2003) Gewebe und Organe. Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 310-311
55. Krieg R, Halbhuber KJ (2010) Detection of endogenous and immuno-bound peroxidase-the status quo in histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 45:81-139
56. Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ (1977) Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J Rheumatol* 4:334-342
57. Lee R, Urban J (1997) Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J* 321 (Pt 1):95-102
58. Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FC, Björklund B, Nap M, Jörnvall H, Schutte B (1999) Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 187:567-572
59. Levick J (1995) Microvascular architecture and exchange in synovial joints. *Microcirculation* 2:217-233
60. Lindl T, Gstraunthaler G (2008) Zellkulturmedien. Zell- und Gewebekultur Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 88-94
61. Lindl T, Gstraunthaler G (2008) Physiologische Zellkulturparameter. Zell- und Gewebekultur Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 117-119
62. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C, Caterson B (1999) Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 344 Pt 1:61-68
63. Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S (1985) Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 34:621-627
64. Lund-Olesen K (1970) Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* 13:769-776
65. Lutwak-Mann C (1940) Enzyme systems in articular cartilage. *Biochem J* 34:517-527
66. Maroudas A, Bullough P (1968) Permeability of articular cartilage. *Nature* 219:1260-1261
67. Melnykovych G, Bishop CF (1972) Utilization of hexoses and synthesis of glycogen in two strains of HeLa cells. *In Vitro* 7:397-405
68. Miot S, Scandiucci de Freitas P, Wirz D, Daniels AU, Sims TJ, Hollander AP, Mainil-Varlet P, Heberer M, Martin I (2006) Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes. *J Orthop Res* 24:1078-1085
69. Mobasheri A (2012) Glucose: an energy currency and structural precursor in articular cartilage and bone with emerging roles as an extracellular signaling molecule and metabolic regulator. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:153

70. Moo EK, Osman NA, Pinguan-Murphy B (2011) The metabolic dynamics of cartilage explants over a long-term culture period. *Clinics (Sao Paulo)* 66:1431-1436
71. Moreira Teixeira LS, Leijten JC, Sobral J, Jin R, van Apeldoorn AA, Feijen J, van Blitterswijk C, Dijkstra PJ, Karperien M (2012) High throughput generated micro-aggregates of chondrocytes stimulate cartilage formation in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater* 23:387-399
72. Mulisch M, Welsch U (2010) Färbungen. In: Moltmann UG, Mechler M (eds) *Romeis Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, p 200
73. Narcisi R, Signorile L, Verhaar JA, Giannoni P, van Osch GJ (2012) TGF β inhibition during expansion phase increases the chondrogenic re-differentiation capacity of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 20:1152-1160
74. Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE, Knudson W (2000) Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 8:127-136
75. Nishimuta JF, Levenston ME (2012) Response of cartilage and meniscus tissue explants to in vitro compressive overload. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20:422-429
76. Ohara H, Tamayama T, Maemura K, Kanbara K, Hayasaki H, Abe M, Watanabe M (2001) Immunocytochemical demonstration of glucose transporters in epiphyseal growth plate chondrocytes of young rats in correlation with autoradiographic distribution of 2-deoxyglucose in chondrocytes of mice. *Acta Histochem* 103:365-378
77. Otte P (1991) Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol* 50:304-312
78. Patwari P, Gaschen V, James IE, Berger E, Blake SM, Lark MW, Grodzinsky AJ, Hunziker EB (2004) Ultrastructural quantification of cell death after injurious compression of bovine calf articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12:245-252
79. Pfander D, Gelse K (2007) Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr Opin Rheumatol* 19:457-462
80. Qu CJ, Pöytäkangas T, Jauhiainen M, Auriola S, Lammi MJ (2009) Glucosamine sulphate does not increase extracellular matrix production at low oxygen tension. *Cell Tissue Res* 337:103-111
81. Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, Teixeira CM, Shapiro IM (1996) Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol* 168:424-432
82. Ramakrishnan PS, Pedersen DR, Stroud NJ, McCabe DJ, Martin JA (2011) Repeated measurement of mechanical properties in viable osteochondral explants following a single blunt impact injury. *Proc Inst Mech Eng H* 225:993-1002
83. Rassow J (2008) *Abbau von Proteinen und Aminosäuren*. Biochemie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, p 155
84. Razaq S, Wilkins RJ, Urban JP (2003) The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus. *Eur Spine J* 12:341-349
85. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254:2669-2676

86. Richardson S, Neama G, Phillips T, Bell S, Carter SD, Moley KH, Moley JF, Vannucci SJ, Mobasheri A (2003) Molecular characterization and partial cDNA cloning of facilitative glucose transporters expressed in human articular chondrocytes; stimulation of 2-deoxyglucose uptake by IGF-I and elevated MMP-2 secretion by glucose deprivation. *Osteoarthritis Cartilage* 11:92-101
87. Rieppo J, Halmesmaki EP, Siitonen U, Laasanen MS, Toyras J, Kiviranta I, Hyttinen MM, Jurvelin JS, Helminen HJ (2003) Histological Differences of Human, Bovine and Porcine Cartilage. 49 th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
88. Rudolf M, Kuhlich W (2008) Varianzanalyse. Biostatistik - Eine Einführung für Biowissenschaftler. Pearson Studium, München, p 336
89. Rudolf M, Kuhlich W (2008) Ausgewählte statistische Tests. Biostatistik - Eine Einführung für Biowissenschaftler. Pearson Studium, München, p 164
90. Russell JB (1993) Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl Environ Microbiol* 59:2844-2850
91. Sah RL, Grodzinsky AJ, Plaas AH, Sandy JD (1990) Effects of tissue compression on the hyaluronate-binding properties of newly synthesized proteoglycans in cartilage explants. *Biochem J* 267:803-808
92. Schiebler T, Schmidt W (2003) Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates. Anatomie, Berlin, pp 138-140
93. Schmidt FH (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander. *Journal of Molecular Medicine* 39:1244-1247
94. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE (1994) A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 311:144-152
95. Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL (2005) Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res* 23:562-568
96. Schutte B, Henfling M, Kölgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, Nap M, Björklund V, Björklund P, Björklund B, Lane EB, Omary MB, Jörnvall H, Ramaekers FC (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 297:11-26
97. Schwartz ER, Kirkpatrick PR, Thompson RC (1976) The effect of environmental pH on glycosaminoglycan metabolism by normal human chondrocytes. *J Lab Clin Med* 87:198-205
98. Stockwell RA (1967) The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 101:753-763
99. Stockwell RA (1978) Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 12:7-13
100. Stockwell RA (1979) Biology of Cartilage Cells. Cambridge University Press, Cambridge
101. Stockwell RA (1991) Cartilage failure in osteoarthritis: Relevance of normal structure and function. A review. *Clinical Anatomy* 4:161 - 191
102. Strangeways TS (1920) Observations on the Nutrition of Articular Cartilage. *Br Med J* 1:661-663
103. Taylor SD, Tsiridis E, Ingham E, Jin Z, Fisher J, Williams S (2012) Comparison of human and animal femoral head chondral properties and geometries. *Proc Inst Mech Eng H* 226:55-62

104. Thal G, Sasse J, Holtzer H, Pacifici M (1986) Differential survival of cartilage and muscle cells in chick limb-bud cell cultures maintained in chemically defined and serum-containing media. *Differentiation* 31:20-28
105. Tonomura H, Takahashi KA, Mazda O, Arai Y, Inoue A, Terauchi R, Shin-Ya M, Kishida T, Imanishi J, Kubo T (2006) Glutamine protects articular chondrocytes from heat stress and NO-induced apoptosis with HSP70 expression. *Osteoarthritis Cartilage* 14:545-553
106. Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22:158-161
107. Urech DM, Feige U, Ewert S, Schlosser V, Ottiger M, Polzer K, Schett G, Lichtlen P (2010) Anti-inflammatory and cartilage-protecting effects of an intra-articularly injected anti-TNF{alpha} single-chain Fv antibody (ESBA105) designed for local therapeutic use. *Ann Rheum Dis* 69:443-449
108. van den Berg F (2003) Strukturen der Funktionseinheit Gelenk. *Angewandte Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 142 - 143
109. Vincent TL, McLean CJ, Full LE, Peston D, Saklatvala J (2007) FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer. *Osteoarthritis Cartilage* 15:752-763
110. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K (1989) Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 71:74-80
111. Walsh WR, Walton M, Bruce W, Yu Y, Gillies RM, Svehla M (2003) Cell Structure and Biology of Bone and Cartilage. In: An YH, Martin KL (eds) *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp 46 - 51
112. Weseloh G, Fießelmann A (1975) Zur Lactatdehydrogenase-Isoenzymverteilung im menschlichen Knorpel. *Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik* 83:345-351
113. Wu MH, Urban JP, Cui ZF, Cui Z, Xu X (2007) Effect of extracellular pH on matrix synthesis by chondrocytes in 3D agarose gel. *Biotechnol Prog* 23:430-434
114. Yang YH, Barabino GA (2011) Requirement for serum in medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for hydrodynamic cultivation of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A* 17:2025-2035
115. Ysart GE, Mason RM (1994) Serum factors, growth factors and UDP-sugar metabolism in bovine articular cartilage chondrocytes. *Biochem J* 303 (Pt 3):713-721
116. Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, Nguyen N, Amin P, Oh J, Henderson DR (2001) Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res* 61:517-525
117. Zielke HR, Zielke CL, Ozand PT (1984) Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc* 43:121-125

IX Anhang

IX.1 Tabellen

Tab. 12: Klassifizierte Häufigkeiten des prozentualen Anteils histomorphologisch vitaler Zellen in der HE-Färbung für die Versuchsgruppen gemeinsam

Häufigkeit	Klasse „Histomorphologische Vitalität“ [%]									
	[0,10]	(10,20]	(20,30]	(30,40]	(40,50]	(50,60]	(60,70]	(70,80]	80,90]	(90,100]
Abs.	1	0	2	5	3	9	12	17	13	2
Relativ	0,02	0,00	0,03	0,08	0,05	0,14	0,19	0,27	0,20	0,03

Tab. 14: Mittelwert und Median des prozentualen Anteils M30-CytoDEATH®-negativer Zellen in den Versuchsgruppen

* = Median = Mittelwert (nur 2 Messwerte in der Gruppe)

° = nur 1 Messwert in der Gruppe

Gruppe	Anteil der nach der M30-CytoDEATH®-Methode vitalen Zellen in Prozent	
	Mittelwert	Median
Kontrollen	79,1	90,2
1 - 16	80,0	85,8
1	71,1	*
2	66,6	68,1
3	92,1	*
4	57,8	*
5	86,4	*
6	96,1	*
7	86,4	*
8	85,3	*
9	54,1	*
10	97,9	*
11	87,5	91,3
12	91,7	*
13	°61,2	°
14	°74,6	°
15	°75,7	°
16	95,2	*

Tab. 16: Statistische Kennwerte des in den Versuchsgruppen kumulativ freigesetzten LDH

Gruppe	Kumuliertes LDH in U (Variationskoeffizient einheitslos)				
	MW	SD	Var.koeff.	Median	Var.breite
1 - 16	0,05	0,04	0,75	0,05	0,28
1	0,05	0,02	0,45	0,05	0,06
2	0,06	0,045	0,74	0,05	0,12
3	0,06	0,03	0,5	0,07	0,08
4	0,08	0,04	0,45	0,08	0,1
5	0,08	0,01	0,18	0,08	0,04
6	0,12	0,08	0,69	0,09	0,2
7	0,04	0,01	0,2	0,04	0,02
8	0,07	0,02	0,32	0,07	0,06

Tab. 16 - Fortsetzung: Statistische Kennwerte des kumulativ freigesetzten LDH

Gruppe	Kumuliertes LDH in U (Variationskoeffizient einheitslos)				
	MW	SD	Var.koeff.	Median	Var.breite
9	0,01	0,02	1,13	0,01	0,04
10	0,03	0,01	0,42	0,03	0,03
11	0,01	0,01	1,67	0	0,02
12	0,04	0,03	0,84	0,03	0,08
13	0,05	0,01	0,12	0,05	0,01
14	0,07	0,01	0,13	0,07	0,02
15	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00
16	0,05	0,01	0,15	0,05	0,02

Tab. 17: Statistische Kennwerte der LDH-Freisetzung in den Versuchsgruppen im Verlauf, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A-H

Inkubationsphase	Statistischer Kennwert	Gruppe								
		Alle:	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14	15 + 16
		Freigesetztes LDH in U (Variationskoeffizient einheitslos)								
A	MW	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SD	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	1,32	0,30	0,37	1,42	1,37	0,79	0,89	0,00	0,00
	Median	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B	MW	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	SD	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	Var.-koeff.	1,69	0,83	0,89	0,00	0,00	0,60	1,03	0,00	1,88
	Median	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C	MW	0,01	0,02	0,02	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	SD	0,03	0,02	0,01	0,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	2,43	1,18	0,65	1,90	0,86	3,46	0,00	0,00	0,00
	Median	0,00	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
D	MW	0,02	0,01	0,01	0,06	0,03	0,00	0,00	0,05	0,02
	SD	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	0,96	0,74	0,46	0,20	0,20	3,46	1,62	0,07	0,07
	Median	0,02	0,01	0,01	0,05	0,03	0,00	0,00	0,05	0,02
		Alle:	2	4	6	8	10	12	14	16
E	MW	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	SD	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	1,30	0,97	0,42	2,45	0,87	0,63	0,38	0,00	1,68
	Median	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
F	MW	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01
	SD	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00
	Var.-koeff.	1,24	0,73	0,60	0,79	0,53	0,78	1,81	0,14	0,13
	Median	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
G	MW	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
	SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	0,75	0,49	0,58	0,61	0,73	0,69	0,63	1,27	0,12
	Median	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
H	MW	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
	SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Var.-koeff.	0,56	0,85	0,70	0,60	0,39	0,32	0,53	0,62	0,22
	Median	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01

Tab. 18: Statistische Kennwerte des Kohlenhydratverbrauchs der Versuchsgruppen im Verlauf, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A-H

Hellgelb = Fructoseverbrauch Hellblau = Glucoseverbrauch

° = aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf $n = 4$ bzw. $n = 1$ (bei Gruppe 10 in Phase H, sodass SD und Var.-koeff. nicht sinnvoll berechenbar) reduziert

Inkubationsphase	Statistischer Kennwert	Gruppe								
		Alle:	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14	15 + 16
		KH-Verbrauch in mg (Var.koeff. einheitslos)								
A	MW	0,35	0,17	0,10	0,00	0,00	0,65	0,55	0,84	0,53
	SD	0,33	0,12	0,10	0,02	0,01	0,09	0,09	0,30	0,10
	Var.-koeff.	0,9	0,7	1,0	3,5	2,5	0,1	0,2	0,4	0,2
	Median	0,34	0,19	0,09	0,00	0,00	0,63	0,55	0,85	0,56
B	MW	0,29	0,02	0,01	0,05	0,09	0,70	0,46	0,65	0,35
	SD	0,28	0,05	0,02	0,06	0,06	0,17	0,06	0,13	0,05
	Var.-koeff.	1,0	2,1	2,4	1,2	0,7	0,2	0,1	0,2	0,1
	Median	0,22	0,00	0,00	0,02	0,10	0,67	0,48	0,62	0,35
C	MW	0,58	0,57	0,27	0,15	0,11	1,27	0,71	1,03	0,49
	SD	0,42	0,26	0,09	0,12	0,07	0,28	0,08	0,17	0,14
	Var.-koeff.	0,7	0,5	0,3	0,8	0,6	0,2	0,1	0,2	0,3
	Median	0,54	0,54	0,27	0,18	0,13	1,29	0,70	1,00	0,55
D	MW	0,36	0,08	0,05	0,28	0,19	0,50	0,38	0,92	0,50
	SD	0,31	0,26	0,05	0,16	0,13	0,23	0,07	0,22	0,08
	Var.-koeff.	0,9	3,4	0,8	0,6	0,7	0,5	0,2	0,2	0,2
	Median	0,34	0,00	0,04	0,28	0,16	0,48	0,38	0,89	0,48
		Alle:	2	4	6	8	10	12	14	16
E	MW	0,37	0,26	0,18	0,04	0,08	0,84	0,53	0,57	0,49
	SD	0,29	0,16	0,09	0,06	0,06	0,24	0,11	0,10	0,05
	Var.-koeff.	0,8	0,6	0,5	1,5	0,7	0,3	0,2	0,2	0,1
	Median	0,44	0,24	0,20	0,00	0,08	0,86	0,50	0,59	0,48
F	MW	0,42	0,06	0,08	0,30	0,16	1,05	0,67	0,52	0,49
	SD	0,33	0,08	0,05	0,03	0,06	0,13	0,04	0,13	0,06
	Var.-koeff.	0,8	1,4	0,6	0,1	0,4	0,1	0,1	0,3	0,1
	Median	0,36	0,03	0,10	0,29	0,16	1,03	0,68	0,50	0,49
G	MW	0,44	0,41	0,28	0,40	0,27	0,69	0,48	°0,56	0,48
	SD	0,17	0,12	0,14	0,17	0,05	0,13	0,06	°0,14	0,04
	Var.-koeff.	0,4	0,3	0,5	0,4	0,2	0,2	0,1	°0,3	0,1
	Median	0,45	0,37	0,23	0,43	0,26	0,73	0,50	°0,55	0,47
H	MW	0,28	0,00	0,00	0,26	0,15	°0,60	°0,44	°0,81	°0,54
	SD	0,28	0,00	0,00	0,10	0,07	°----	°0,06	°0,09	°0,25
	Var.-koeff.	1,0	0,0	0,0	0,4	0,5	°----	°0,1	°0,1	°0,5
	Median	0,20	0,00	0,00	0,24	0,14	°0,60	°0,44	°0,81	°0,56

Zu Tab. 19 (s. nächste Seite):

In der Tabelle sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede im Kohlenhydratverbrauch und seiner Post-hoc-Analyse - dem zweiseitigen, Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test - dargestellt. Beide Tests wurden für jede Inkubationsphase A-H separat durchgeführt. Post hoc wurden i. R. des U-Tests nur jene Paare verglichen, die sich in ausschließlich einer Versuchsbedingung unterschieden. Die Ausprägungsvariante dieses Einflussfaktors ist in der Tabelle in der Spalte „Paarvergleich“ unter der jeweiligen Gruppenbezeichnung vermerkt.

Nullhypothesen H_0 :

H-Test: Es gibt keine Lageunterschiede zwischen den Verteilungen des KH-Verbrauchs aller Gruppen.

U-Test: Es gibt keinen Lageunterschied zwischen den Verteilungen des KH-Verbrauchs der zwei verglichenen Experimentalgruppen.

Alternativhypothesen:

H-Test: H_A : Es gibt Lageunterschiede zwischen den Verteilungen des KH-Verbrauchs für mindestens ein Gruppenpaar (nicht lokalisiert).

U-Test: H_I/H_{II} : Es gibt einen Lageunterschied zwischen den Verteilungen des KH-Verbrauchs der zwei verglichenen Experimentalgruppen.

H_I : Die Verteilung des KH-Verbrauchs der ersten Gruppe im Paarvergleich (Spalte I) ist rechtsverschoben, d. h. der Verbrauch dieser Gruppe ist größer als jener der zweiten Gruppe (Spalte II).

H_{II} : Die Verteilung des KH-Verbrauchs der ersten Gruppe im Paarvergleich (Spalte I) ist linksverschoben, d. h. der Verbrauch dieser Gruppe ist kleiner als jener der zweiten Gruppe (Spalte II).

Neben der entsprechenden Testentscheidung (H_I bzw. H_{II}) ist in der Spalte „ \rightarrow “ vermerkt, welche Ausprägung der Versuchsbedingung, in der sich die beiden verglichenen Gruppen unterschieden, der jeweils anderen hinsichtlich eines höheren KH-Verbrauchs überlegen war.

Signifikanzniveaus:

H-Test: $\alpha = 0,05$


U-Test: Das multiple Signifikanzniveau α' wurde für 12 Paarvergleiche nach der Bonferroni-Korrektur adjustiert:

$$\alpha' = 0,05/12 = 0,0042.$$

Tab. 19: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede im Kohlenhydratverbrauch in je einer Inkubationsphase A-H und seiner Post-hoc-Analyse (zweiseitiger, Bonferroni-korrigierter Mann-Whitney-U-Test für Paare, die sich in einer Versuchsbedingung unterschieden)

Legende:

χ^2	=	Teststatistik des H-Tests (für Stichprobenumfänge $n > 5$ näherungsweise Chi-Quadrat-verteilt (Rudolf and Kuhlisch, p. 336, 2008))
f	=	Freiheitsgrade
U	=	Teststatistik des U-Tests
$\sim\Delta$	=	geschätzter Lageunterschied zwischen den Verteilungen des KH-Verbrauchs der beiden verglichenen Gruppen
\rightarrow	=	Testentscheidung
Fruct / F	=	Fructose
Gluc / G	=	Glucose
\emptyset FCS / \emptyset	=	kein FCS
5 mL / 5	=	5 mL Medium pro Well
2 mL / 2	=	2 mL Medium pro Well
E	=	$\times 10^{\wedge}$
Inf	=	unendlich
°	=	aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf $n = 4$ bzw. bei Gruppe 10 in Phase H auf $n = 1$ reduziert (dadurch veränderte, hier nicht genannte kritische Werte für U)

 = Ergebnisse sind signifikant

Phase	Paarvergleich		H-Test Quantil $\chi^2_{f, \alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07		U-Test Kritische Werte: $U_{n=12, n=12, \alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6, n=6, \alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
	I	vs. II	χ^2	p-Wert	U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	\rightarrow
A	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	82,63	3,99E-15*	0	-0,49	(-0,59) - (-0,37)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		\rightarrow	0	-0,47	(-0,53) - (-0,38)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H _A	0	-0,82	(-0,99) - (-0,60)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			0	-0,56	(-0,59) - (0,48)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	1 + 2 \emptyset FCS	5 + 6 FCS			130	0,19	0,06 - 0,26	0,00013*	H _I \emptyset > FCS
	3 + 4 \emptyset FCS	7 + 8 FCS			129	0,08	0,03 - 0,13	0,00023*	H _I \emptyset > FCS
	9 + 10 \emptyset FCS	13 + 14 FCS			41,5	-0,17	(-0,33) - 0,01	0,08035	H ₀
	11 + 12 \emptyset FCS	15 + 16 FCS			75,5	0,01	(-0,07) - 0,09	0,8528	H ₀
	1 + 2 5 mL	3 + 4 2 mL			95,5	0,09	(-0,04) - 0,20	0,1814	H ₀
	5 + 6 5 mL	7 + 8 2 mL			67	-0,01	(-0,02) - 0,02	1	H ₀

Tab. 19 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (Kohlenhydratverbrauch)

Phase	Paarvergleich		H-Test		U-Test				
	I	vs. II	Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07	p-Wert	Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
			χ^2		U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	→
A	9 + 10 5 mL	11 + 12 2 mL	82,63	3,99E-15*	114	0,1	0,02 - 0,19	0,01431	H_0
	13 + 14 5 mL	15 + 16 2 mL		→ H_A	125	0,3	0,06 - 0,44	7,4E-07*	H_I $5 > 2$
B	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	83,94	2,16E-15*	0	-0,65	(-0,79) - (-0,57)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→ H_A	0	-0,47	(-0,49) - (-0,39)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc			0	-0,58	(-0,65) - (-0,51)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			0	-0,27	(-0,31) - (-0,21)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	1 + 2 Ø FCS	5 + 6 FCS			52	-0,01	(-0,07) - 0,01	0,193	H_0
	3 + 4 Ø FCS	7 + 8 FCS			32,5	-0,09	(-0,12) - 0,0	0,01369	H_0
	9 + 10 Ø FCS	13 + 14 FCS			88	0,05	(-0,09) - 0,18	0,3693	H_0
	11 + 12 Ø FCS	15 + 16 FCS			134	0,12	0,07 - 0,16	8,4E-05*	H_I $\emptyset > FCS$
	1 + 2 5 mL	3 + 4 2 mL			70,5	-0,01	(-0,02) - 0,05	0,8921	H_0
	5 + 6 5 mL	7 + 8 2 mL			43,5	-0,05	(-0,11) - 0,01	0,09445	H_0
	9 + 10 5 mL	11 + 12 2 mL			129	0,22	0,11 - 0,32	0,00045*	H_I $5 > 2$
	13 + 14 5 mL	15 + 16 2 mL			144	0,27	0,21 - 0,35	7,4E-07*	H_I $5 > 2$
	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc		3,21E-15*	5	-0,72	(-0,95) - (-0,47)	1,41E-05*	H_{II} $G > F$
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→ H_A	0	-0,45	(-0,52) - (-0,36)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc			0	-0,89	(-1,01) - (-0,74)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			0	-0,41	(-0,49) - (-0,26)	7,4E-07*	H_{II} $G > F$
C	1 + 2 Ø FCS	5 + 6 FCS	83,10		139,5	0,39	0,22 - 0,62	1,18E-05*	H_I $\emptyset > FCS$
	3 + 4 Ø FCS	7 + 8 FCS			132,5	0,16	0,08 - 0,23	0,00016*	H_I $\emptyset > FCS$
	9 + 10 Ø FCS	13 + 14 FCS			111,5	0,26	0,03 - 0,43	0,0212	H_0
	11 + 12 Ø FCS	15 + 16 FCS			137	0,21	0,10 - 0,32	3,11E-05*	H_I $\emptyset > FCS$
	1 + 2 5 mL	3 + 4 2 mL			127,5	0,25	0,11 - 0,46	0,0007*	H_I $5 > 2$
	5 + 6 5 mL	7 + 8 2 mL			88	0,04	(-0,08) - 0,14	0,3656	H_0
	9 + 10 5 mL	11 + 12 2 mL			142	0,58	0,41 - 0,70	2,96E-06*	H_I $5 > 2$

Tab. 19 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (Kohlenhydratverbrauch)

Phase	Paarvergleich		H-Test		U-Test				
	I	vs. II	Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07	p-Wert	Kritische Werte: $U_{n=12, n=12, \alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6, n=6, \alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
			χ^2		U	$\sim \Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	→
C	13 + 14 5 mL	15 + 16 2 mL	S. O.	S. O.	144	0,53	0,39 - 0,70	7,4E-07*	H _I 5 > 2
	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	70,74	1,05E-12*	12	-0,45	(-0,61) - (-0,35)	0,00013*	H _{II} G > F
D	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→	0	-0,33	(-0,38) - (-0,28)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H _A	0	-0,64	(-0,82) - (-0,47)	7,4E-07*	H _{II} G > F
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			4	-0,33	(-0,41) - (-0,24)	7,4E-06*	H _{II} G > F
	1 + 2 Ø FCS	5 + 6 FCS			18	-0,27	(-0,34) - (-0,15)	0,0006*	H _{II} FCS > Ø
	3 + 4 Ø FCS	7 + 8 FCS			20,5	-0,12	(-0,20) - (-0,04)	0,00191*	H _{II} FCS > Ø
	9 + 10 Ø FCS	13 + 14 FCS			10	-0,41	(-0,62) - (-0,21)	0,00010*	H _{II} FCS > Ø
	11 + 12 Ø FCS	15 + 16 FCS			13,5	-0,12	(-0,19) - (-0,05)	0,00029*	H _{II} FCS > Ø
	1 + 2 5 mL	3 + 4 2 mL			30	-0,04	(-0,09) - 0,0	0,007307	H ₀
	5 + 6 5 mL	7 + 8 2 mL			95,5	0,08	(-0,03) - 0,20	0,1824	H ₀
	9 + 10 5 mL	11 + 12 2 mL			106,5	0,13	0,0 - 0,25	0,04651	H ₀
	13 + 14 5 mL	15 + 16 2 mL			144	0,39	0,24 - 0,56	7,4E-07*	H _I 5 > 2
E	2 Fruct	10 Gluc	39,21	1,8E-06*	0	-0,6	(-0,89) - (-0,23)	0,00217*	H _{II} G > F
	4 Fruct	12 Gluc		→	0	-0,32	(-0,51) - (-0,23)	0,00217*	H _{II} G > F
	6 Fruct	14 Gluc		H _A	0	-0,53	(-0,65) - (-0,43)	0,00217*	H _{II} G > F
	8 Fruct	16 Gluc			0	-0,41	(-0,48) - (-0,33)	0,00217*	H _{II} G > F
	2 Ø FCS	6 FCS			33	0,24	0,07 - 0,45	0,01515	H ₀
	4 Ø FCS	8 FCS			30	0,11	(-0,02) - 0,18	0,06494	H ₀
	10 Ø FCS	14 FCS			30,5	0,28	0,0 - 0,51	0,04329	H ₀
	12 Ø FCS	16 FCS			20,5	0,02	(-0,06) - 0,17	0,7381	H ₀
	2 5 mL	4 2 mL			25,5	0,06	(-0,11) - 0,25	0,2576	H ₀
	6 5 mL	8 2 mL			8	-0,04	(-0,13) - 0,03	0,1126	H ₀
	10 5 mL	12 2 mL			31	0,35	0,02 - 0,58	0,04113	H ₀
	14 5 mL	16 2 mL			25	0,1	(-0,03) - 0,21	0,2879	H ₀

Tab. 19 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (Kohlenhydratverbrauch)

Phase	Paarvergleich		H-Test		U-Test				
	I	vs. II	Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07	p-Wert	Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
			χ^2		U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	→
F	2	10	43,95	2,19E-07*	0	-0,98	(-1,18) - (-0,84)	0,00217*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,58	(-0,65) - (-0,51)	0,00217*	H_{II} $G > F$
	4	12			0	-0,2	(-0,39) - (-0,08)	0,00217*	H_{II} $G > F$
	Fruct	Gluc			0	-0,34	(-0,42) - (-0,26)	0,00217*	H_{II} $G > F$
	6	14			0	-0,28	(-0,33) - (-0,14)	0,00217*	H_{II} $FCS > \emptyset$
	Fruct	Gluc			7	-0,08	(-0,16) - 0,01	0,08874	H_0
	8	16			36	0,54	0,35 - 0,71	0,00217*	H_I $\emptyset > FCS$
	Fruct	Gluc			36	0,16	0,11 - 0,24	0,00217*	H_I $\emptyset > FCS$
	2	6			10	-0,05	(-0,13) - 0,08	0,2165	H_0
	\emptyset FCS	FCS			36	0,15	0,07 - 0,22	0,00217*	H_I $5 > 2$
	4	8			36	0,36	0,26 - 0,54	0,00217*	H_I $5 > 2$
	\emptyset FCS	FCS			18,5	0,01	(-0,13) - 0,19	0,9697	H_0
	10	14			2	-0,32	(-0,46) - (-0,09)	0,00866	H_0
	\emptyset FCS	FCS			5,5	-0,24	(-0,32) - 0,0	0,04329	H_0
G	12	16	26,3	0,00045*	5,5	-0,12	(-0,55) - 0,09	0,181	H_0
	\emptyset FCS	FCS			0	-0,21	(-0,27) - (-0,13)	0,00217*	H_{II} $G > F$
	2	4			14,5	-0,04	(-0,20) - 0,24	0,619	H_0
	5 mL	2 mL			14	-0,04	(-0,11) - (0,21)	0,5671	H_0
	6	8			20	0,14	(-0,10) - 0,37	0,1143	H_0
	5 mL	2 mL			18,5	0,01	(-0,07) - 0,07	0,9481	H_0
	10	12			31	0,13	0,03 - 0,27	0,04113	H_0
	5 mL	2 mL			29,5	0,17	(-0,12) - 0,30	0,07143	H_0
	14	16			32	0,23	0,06 - 0,33	0,02597	H_0
	5 mL	2 mL			13	0,06	(-0,08) - 0,24	0,9286	H_0
	\emptyset FCS	FCS							
	2	4							
	5 mL	2 mL							
	6	8							
	5 mL	2 mL							

Tab. 19 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (Kohlenhydratverbrauch)

Phase	Paarvergleich		H-Test		U-Test				
	I	vs. II	Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für $f=7$ und $\alpha=0,05$: 14,07	p-Wert	Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
			χ^2		U	$\sim\Delta$ [mg]	95%-KI [mg]	p-Wert	→
H	2	°10	34,72	1,26E-05*	0	-Inf	(-0,6) - (-0,6)	0,1429	H ₀
	Fruct	Gluc			0	-0,44	(-0,50) - (-0,38)	0,004762	H ₀
	4	°12			0	-0,55	(-0,71) - (-0,41)	0,009524	H ₀
	Fruct	Gluc			0	-0,39	(-0,50) - (-0,25)	0,009524	H ₀
	6	°14			0	-0,25	(-0,42) - (-0,14)	0,00217*	H _{II} FCS > Ø
	Fruct	Gluc			0	-0,14	(-0,24) - (-0,07)	0,00217*	H _{II} FCS > Ø
	8	°16			0	-0,21	(-0,31) - (-0,12)	0,4	H ₀
	Fruct	Gluc			2	-0,09	(-0,22) - 0,07	0,08571	H ₀
	2	6			18	-Inf	0,0 - 0,0	1	H ₀
	Ø FCS	FCS			30,5	0,11	0,0 - 0,22	0,04762	H ₀
	4	8			4	0,16	0,1 - 0,22	0,4	H ₀
	Ø FCS	FCS			16	0,3	0,12 - 0,48	0,02857	H ₀
	°10	°14							
	Ø FCS	FCS							
	°12	°16							
	Ø FCS	FCS							
	2	4							
	5 mL	2 mL							
	6	8							
	5 mL	2 mL							
	°10	°12							
	5 mL	2 mL							
	°14	°16							
	5 mL	2 mL							

Tab. 20: Statistische Kennwerte der Lactatproduktion der Versuchsgruppen im Verlauf, gemessen in 48-stündigen Abständen zu den Zeitpunkten A - H

° = aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf $n = 4$ bzw. $n = 1$ (bei Gruppe 10 in Phase H, sodass SD und Var.-koeff. nicht sinnvoll berechenbar) reduziert

Inkubationsphase	Statistischer Kennwert	Gruppe								
		Alle:	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14	15 + 16
		Lactatproduktion in mg (Var.koeff. einheitslos)								
A	MW	0,43	0,24	0,20	0,32	0,17	0,65	0,58	0,58	0,66
	SD	0,21	0,06	0,04	0,10	0,10	0,08	0,11	0,09	0,11
	Var.-koeff.	0,5	0,3	0,2	0,3	0,5	0,1	0,2	0,2	0,2
	Median	0,45	0,24	0,21	0,28	0,15	0,67	0,59	0,59	0,64
B	MW	0,46	0,16	0,12	0,34	0,26	0,78	0,72	0,75	0,50
	SD	0,30	0,05	0,04	0,05	0,03	0,18	0,40	0,16	0,05
	Var.-koeff.	0,7	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,6	0,2	0,1
	Median	0,40	0,16	0,12	0,34	0,26	0,79	0,62	0,76	0,51
C	MW	0,43	0,17	0,13	0,22	0,22	0,67	0,47	0,96	0,56
	SD	0,35	0,06	0,09	0,05	0,07	0,14	0,06	0,57	0,07
	Var.-koeff.	0,8	0,3	0,7	0,2	0,3	0,2	0,1	0,6	0,1
	Median	0,34	0,18	0,11	0,23	0,22	0,67	0,47	0,80	0,53

Tab. 20 - Fortsetzung: Statistische Kennwerte der Lactatproduktion im Verlauf

Phase	Statist. Kennwert	Lactatproduktion in mg (Var.koeff. einheitslos)								
D		0,41	0,21	0,17	0,25	0,21	0,64	0,46	0,73	0,63
		0,24	0,05	0,05	0,09	0,05	0,28	0,07	0,13	0,06
	Var.-koeff.	0,6	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1
	Median	0,31	0,20	0,19	0,27	0,22	0,60	0,45	0,73	0,64
Alle:		2	4	6	8	10	12	14	16	
E	MW	0,36	0,16	0,13	0,24	0,17	0,54	0,43	0,66	0,52
	SD	0,20	0,02	0,04	0,06	0,06	0,13	0,05	0,05	0,05
	Var.-koeff.	0,6	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1
	Median	0,33	0,15	0,14	0,25	0,17	0,50	0,43	0,65	0,51
F	MW	0,30	0,19	0,13	0,24	0,17	0,34	0,35	0,48	0,48
	SD	0,14	0,02	0,04	0,06	0,06	0,09	0,05	0,05	0,05
	Var.-koeff.	0,5	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1
	Median	0,28	0,20	0,14	0,27	0,18	0,33	0,37	0,48	0,50
G	MW	0,29	0,10	0,07	0,19	0,17	0,35	0,36	°0,69	0,54
	SD	0,22	0,03	0,04	0,11	0,05	0,16	0,12	°0,11	0,05
	Var.-koeff.	0,7	0,3	0,6	0,6	0,3	0,5	0,3	°0,2	0,1
	Median	0,24	0,08	0,08	0,24	0,17	0,35	0,39	°0,67	0,55
H	MW	0,29	0,11	0,08	0,18	0,16	°0,62	°0,46	°0,68	°0,63
	SD	0,24	0,04	0,05	0,10	0,04	°----	°0,06	°0,06	°0,08
	Var.-koeff.	0,8	0,3	0,6	0,5	0,3	°----	°0,1	°0,1	°0,1
	Median	0,20	0,09	0,09	0,20	0,17	°0,62	°0,44	°0,66	°0,67

Tab. 22: Statistische Kennwerte der Differenz zwischen Kohlenhydratverbrauch und Lactatproduktion der Versuchsgruppen im Verlauf, berechnet für die 48-stündigen Inkubationsphasen A - H

° = aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf n = 4 bzw. n = 1 (bei Gruppe 10 in Phase H, sodass SD und Var.-koeff. nicht sinnvoll berechenbar) reduziert

Inkubationsphase	Statistischer Kennwert	Gruppe								
		Alle:	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14	15 + 16
		KH-Verbrauch minus Lactatproduktion in mg (Var.koeff. einheitslos)								
A	MW	-0,07	-0,08	-0,10	-0,31	-0,17	0,00	-0,03	0,26	-0,12
	SD	0,21	0,13	0,08	0,10	0,10	0,10	0,08	0,33	0,11
	Var.-koeff.	-3,0	-1,6	-0,8	-0,3	-0,6	25,9	-2,4	1,3	-0,9
	Median	-0,09	-0,05	-0,12	-0,28	-0,14	0,03	-0,01	0,22	-0,12
B	MW	-0,16	-0,14	-0,11	-0,29	-0,18	-0,09	-0,26	-0,10	-0,15
	SD	0,18	0,07	0,03	0,08	0,06	0,23	0,41	0,14	0,03
	Var.-koeff.	-1,1	-0,5	-0,3	-0,3	-0,3	-2,6	-1,6	-1,4	-0,2
	Median	-0,15	-0,16	-0,11	-0,31	-0,18	-0,11	-0,13	-0,10	-0,15
C	MW	0,15	0,40	0,14	-0,07	-0,10	0,60	0,24	0,07	-0,07
	SD	0,35	0,25	0,13	0,13	0,09	0,26	0,11	0,62	0,12
	Var.-koeff.	2,3	0,6	0,9	-1,8	-0,9	0,4	0,5	8,7	-1,7
	Median	0,14	0,36	0,15	-0,05	-0,09	0,66	0,21	0,22	-0,08
D	MW	-0,05	-0,14	-0,12	0,02	-0,03	-0,14	-0,08	0,07	-0,13
	SD	0,22	0,27	0,05	0,18	0,12	0,36	0,07	0,62	0,07
	Var.-koeff.	-4,2	-2,0	-0,4	7,7	-4,7	-2,7	-0,9	8,7	-0,5
	Median	-0,08	-0,19	-0,10	-0,03	-0,06	-0,12	-0,07	0,22	-0,13

Tab. 22 - Fortsetzung: Statistische Kennwerte der Differenz zwischen Kohlenhydratverbrauch und Lactatproduktion im Verlauf

Phase	Statist. Kennwert	KH-Verbrauch minus Lactatproduktion in mg (Var.koeff. einheitslos)								
		Alle:	2	4	6	8	10	12	14	16
E	MW	0,02	0,10	0,04	-0,20	-0,09	0,29	0,10	-0,09	-0,03
	SD	0,18	0,17	0,07	0,05	0,10	0,13	0,11	0,13	0,05
	Var.-koeff.	11,5	1,7	1,5	-0,3	-1,1	0,5	1,1	-1,4	-1,5
	Median	0,02	0,07	0,05	-0,21	-0,13	0,35	0,07	-0,05	-0,03
F	MW	0,12	-0,14	-0,04	0,07	-0,01	0,71	0,32	0,04	0,01
	SD	0,26	0,08	0,04	0,05	0,06	0,04	0,03	0,13	0,02
	Var.-koeff.	2,2	-0,6	-1,0	0,8	-6,5	0,1	0,1	3,3	1,5
	Median	0,02	-0,16	-0,03	0,06	-0,01	0,70	0,32	0,07	0,01
G	MW	0,15	0,31	0,22	0,21	0,11	0,34	0,12	°0,13	-0,06
	SD	0,20	0,11	0,13	0,27	0,04	0,17	0,11	°0,10	0,06
	Var.-koeff.	1,3	0,4	0,6	1,3	0,4	0,5	1,0	°-0,8	-0,9
	Median	0,15	0,26	0,16	0,18	0,09	0,30	0,08	°-0,16	-0,05
H	MW	-0,02	-0,11	-0,08	0,08	-0,01	°-0,02	°-0,02	°0,14	°-0,10
	SD	0,12	0,04	0,05	0,17	0,05	°----	°0,04	°0,12	°0,01
	Var.-koeff.	-6,3	-0,3	-0,6	2,2	-3,7	°----	°-2,5	°0,9	°-0,1
	Median	-0,04	-0,09	-0,09	0,03	-0,01	°-0,02	°-0,03	°0,16	°-0,10

Tab. 23: Mittelwert des pH-Werts im Verlauf, gemessen in den Medienüberständen der Versuchsgruppen nach den je 48-stündigen Inkubationsphasen A - H

° = aufgrund von Kontaminationen Stichproben-, i. e. Gruppenumfang, auf n = 4 bzw. n = 1 (Gruppe 10 in Phase H) reduziert

Inkubationsphase	Gruppe							
	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14	15 + 16
Durchschnittlicher pH-Wert								
A	7,40	7,40	7,40	7,39	7,21	7,03	7,21	7,03
B	7,34	7,33	7,35	7,32	7,17	7,00	7,13	6,97
C	7,36	7,29	7,31	7,29	7,15	7,02	7,11	6,95
D	7,32	7,30	7,32	7,28	7,16	7,02	7,08	6,96
	2	4	6	8	10	12	14	16
E	7,33	7,29	7,32	7,31	7,20	7,06	7,11	6,99
F	7,32	7,30	7,31	7,29	7,21	7,07	7,08	7,00
G	7,33	7,31	7,29	7,27	7,20	7,06	°7,05	6,96
H	7,32	7,28	7,30	7,27	°7,11	°7,01	°7,06	°6,92

Zu **Tab. 24** (s. nächste Seite):

In der Tabelle sind die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests (H-Test) auf Unterschiede im pH-Wert und seiner Post-hoc-Analyse - dem zweiseitigen, Bonferroni-korrigierten Mann-Whitney-U-Test - dargestellt. Beide Tests wurden für jede Inkubationsphase A - H separat durchgeführt. Post hoc wurden i. R. des U-Tests nur jene Paare verglichen, die sich ausschließlich im eingesetzten Kohlenhydrat unterschieden.

Null- und Alternativhypothesen ergeben sich analog zu den für den KH-Verbrauch (**Tab. 19**) formulierten Hypothesen (s. Seite 93).

Tab. 24 - Fortsetzung: Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Analyse (pH-Wert)

Phase	Paarvergleich		H-Test Quantil $\chi^2_{f,1-\alpha}$ für f=7 und $\alpha=0,05$: 14,07		U-Test Kritische Werte: $U_{n=12,n=12,\alpha=0,05}$: 42 (Phasen A-D) $U_{n=6,n=6,\alpha=0,05}$: 7 (Phasen E-H)				
	I	vs. II	χ^2	p-Wert	U	$\sim\Delta$	95%-KI	p-Wert	→
C	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	81,51	6,77E-15*	141	0,19	0,15 - 0,22	6,66E-06*	H_1 F > G
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→	144	0,28	0,24 - 0,31	7,4E-07*	H_1 F > G
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H_A	144	0,2	0,17 - 0,22	7,4E-07*	H_1 F > G
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			144	0,36	0,32 - 0,38	7,4E-07*	H_1 F > G
D	1 + 2 Fruct	9 + 10 Gluc	79,74	1,56E-14*	138	0,18	0,13 - 0,21	2,52E-05*	H_1 F > G
	3 + 4 Fruct	11 + 12 Gluc		→	144	0,27	0,23 - 0,32	7,4E-07*	H_1 F > G
	5 + 6 Fruct	13 + 14 Gluc		H_A	144	0,23	0,19 - 0,26	7,4E-07*	H_1 F > G
	7 + 8 Fruct	15 + 16 Gluc			144	0,32	0,29 - 0,35	7,4E-07*	H_1 F > G
E	2 Fruct	10 Gluc	40,61	9,64E-07*	34,5	0,14	0,06 - 0,20	0,00649*	H_1 F > G
	4 Fruct	12 Gluc		→	36	0,21	0,16 - 0,26	0,00217*	H_1 F > G
	6 Fruct	14 Gluc		H_A	36	0,22	0,15 - 0,27	0,00217*	H_1 F > G
	8 Fruct	16 Gluc			36	0,33	0,28 - 0,35	0,00217*	H_1 F > G
F	2 Fruct	10 Gluc	41,89	5,46E-07*	36	0,11	0,06 - 0,14	0,00217*	H_1 F > G
	4 Fruct	12 Gluc		→	36	0,22	0,15 - 0,26	0,00217*	H_1 F > G
	6 Fruct	14 Gluc		H_A	36	0,22	0,19 - 0,30	0,00217*	H_1 F > G
	8 Fruct	16 Gluc			36	0,29	0,21 - 0,35	0,00217*	H_1 F > G
G	2 Fruct	10 Gluc	42,56	4,06E-07*	36	0,14	0,08 - 0,18	0,00217*	H_1 F > G
	4 Fruct	12 Gluc		→	36	0,26	0,18 - 0,29	0,00217*	H_1 F > G
	6 Fruct	14 Gluc		H_A	24	0,23	0,20 - 0,26	0,00476*	H_1 F > G
	8 Fruct	16 Gluc			36	0,31	0,27 - 0,36	0,00217*	H_1 F > G
H	2 Fruct	10 Gluc	30,98	6,28E-05*	6	0,17	0,14 - 0,19	0,29	H_0
	4 Fruct	12 Gluc		→	24	0,28	0,18 - 0,33	0,01*	H_1 F > G
	6 Fruct	14 Gluc		H_A	24	0,22	0,17 - 0,28	0,01*	H_1 F > G
	8 Fruct	16 Gluc			24	0,34	0,29 - 0,37	0,01*	H_1 F > G

Tab. 25: Klassifizierte Häufigkeiten der prozentualen Zunahme des Nassgewichts der Knorpelproben während der gesamten Versuchsdauer für die Versuchsgruppen gemeinsam

Häufigkeit	Klasse „Nassgewichtszunahme“ [%]						
	[-40,-20]	(-20,0]	(0,20]	(20,40]	(40,60]	(60,80]	(80,100]
Absolut	1	23	41	23	6	1	0
Relativ	0,01	0,24	0,43	0,24	0,06	0,01	0,00

Tab. 26: Statistische Kennwerte der prozentualen Nassgewichtszunahme der Knorpelchips der Versuchsgruppen

Gruppe	Nassgewichtszunahme in % (Variationskoeffizient einheitslos)				
	MW	SD	Var.koeff.	Median	Var.breite
1 - 16	15,1	20,1	1,3	13,5	135
1	10,7	21,7	2,0	11,0	49
2	16,8	8,2	0,5	15,0	23
3	0,2	10,0	50,0	-1,0	31
4	13,2	8,0	0,6	13,0	23
5	8,3	16,4	2,0	8,5	47
6	27,2	16,6	0,6	30,0	49
7	2,2	9,5	4,3	2,0	26
8	22,7	26,0	1,1	14,5	70
9	30,3	13,1	0,4	29,0	36
10	25,8	17,7	0,7	21,0	43
11	-2,5	5,6	-2,2	-2,5	13
12	5,7	28,7	5,0	3,0	86
13	21,7	16,9	0,8	22,5	48
14	40,5	31,6	0,8	29,0	85
15	3,5	15,3	4,4	-0,5	45
16	16,0	11,9	0,7	15,0	30

IX.2 Verzeichnis der akademischen LehrerInnen

Meine akademischen LehrerInnen an der Philipps-Universität Marburg
waren die Damen und Herren

Adamkiewicz, Alter, Aumüller, Bahr, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker K., Becker S., Benes, Büch, Czubayko, Daut, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Ellenrieder, Eggert, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg C., Görg K., Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Hassan, Hertl, Höffken, Höglinger, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kaltenborn, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Klose, König, Koolman, Kruse, Kühnert, Leonhardt, Leube, Lill, Löffler, Lohoff, Lukasewitz, Maier, Maisch, Mandrek, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Printz, Renz, Richter, Riße, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schofer, Schrader, Schu, Sekundo, Steiniger, Steinkamp, Tackenberg, Vassiliou, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin, Ziring, Zoremba und Zwiorek.

IX.3 Dank

Mein Dank gilt ...

... Herrn Prof. Dr. med. S. Ruchholtz und Herrn Prof. Dr. D. B. Jones (PhD M.I. Biol.) für die Überlassung des Themas, Bereitstellung der laboratorischen Kapazitäten, Hilfe bei der Versuchsplanung und Korrektur der Niederschrift.

... Herrn Dr. med. A. Krüger, OA an der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, für die Korrektur der Niederschrift.

... Frau M. Kratz, MTA, für Anleitung und Hilfe bei der Versuchsplanung, praktischen Durchführung und Auswertung.

... Frau Dr. med. M. Roeßler, OÄ am Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg, für die methodische Beratung zur Zellvitalitätsbestimmung.

... Herrn Prof. Dr. med. M. Ocker, vormals Leiter des Instituts der Chirurgischen Forschung der Universität Marburg, und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. med. K. Quint für die methodische Beratung bei Versuchsplanung sowie Etablierung der M30-CytoDEATH®-Methode.

... Herrn PD Dr. T. Stief, Mitarbeiter des Zentrallaboratoriums am Standort Marburg des UKGM (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik) für die Bestimmung der Lactat- und LDH-Konzentration in den Medienüberständen (Studennummer 166).

... den Mitarbeitern des Zentrums für Pathologie des UKGM (Standort Marburg) für die Unterstützung bei der Probeneinbettung in Paraffin und HE-Färbung der Gewebeschnitte.

... dem Schlachterbetrieb Manger aus Wetter (Hessen) für die Bereitstellung der beiden bovinen Schultergelenke.

... meiner Familie und meinen Freunden.